

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 7 日 (07.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/061704 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/00, A61K 39/395, 45/00, A61P 35/00, 43/00, G01N 33/15, 33/50, C07K 16/18

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019724

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 22 日 (22.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-427782
2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 砂原 英次 (SUNAHARA, Eiji) [JP/JP]; 〒3000331 茨城県稲敷郡阿見町大字阿見 5 3 5 1-5 Ibaraki (JP). 石井 尚書 (ISHII, Takafumi) [JP/JP]; 〒6620084 兵庫県西宮市樋之池町 7-5-4 1 O Hyogo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PREVENTIVE/REMEDY FOR CANCER

(54) 発明の名称: 癌の予防・治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a substance inhibiting the binding of a protein containing an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:10, its partial peptide or a salt thereof to a protein containing an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26, its partial peptide or a salt thereof; and a preventive/remedy for cancer, an apoptosis promoter for cancer cells, a growth inhibitor for cancer cells and so on containing the above substance.

(57) 要約: 本発明は、配列番号: 1、配列番号: 4、配列番号: 7 または配列番号: 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号: 26 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害する物質、そのような物質を含有する癌などの予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などを提供する。

WO 2005/061704 A1

明細書

癌の予防・治療剤

5 技術分野

本発明は、SEMA4Bタンパク質等とPlexinB1タンパク質等との結合を阻害する物質（例、抗体）、SEMA4Bタンパク質等およびPlexinB1タンパク質の活性を阻害する物質（例、抗体）、該物質を含有する癌の予防・治療剤またはアポトーシス促進剤、癌の予防・治療剤またはアポトーシス促進剤のスクリーニングなどに関する。

背景技術

近年のマイクロアレイ・オリゴヌクレオチドアレイ技術の進歩により、遺伝子発現の網羅的な解析が可能となってきた。癌においても遺伝子のマイクロアレイプロファイリングデータでその病態が評価しうることも予見され、実際、白血

15 病においては遺伝子発現プロファイルによる白血病的分類が可能であることが報告されている。また個々の癌組織の遺伝子発現プロファイルを明らかにし、その分類を積み重ねることによって、特定の癌治療法に対する反応性を予測したり特定の癌に対する新たな創薬標的タンパク質を発見したりすることが可能となると考

20 えられる。具体的には、ある種の癌である種のタンパク質の発現亢進が認められる場合には、新たに抗原陽性と診断された患者に対して (i) その発現量を低下させる、(ii) 機能を抑制する、(iii) 該タンパク質に対する宿主免疫応答を顕在化させる等の方法によって抗腫瘍活性を導くことが可能となる。これと同時に、

25 患者に無用な負担をかける懸念がなくなると予想される。以上のように発現プロファイル解析は、癌の分子診断と分子標的治療薬の開発に多大な貢献をなしうるものと期待されている。

Semaphorinファミリーは、分泌型分子と膜結合型分子の両方から構成される大きなタンパク質ファミリーで、脊椎動物で少なくとも19種、非脊椎動物で3種の遺

伝子が報告されている (Cell 97巻, 551-552頁, 1999年)。

Semaphorinファミリーは神経軸索誘導やシナプス形成などに代表される広範囲な神経発生過程に関わることが知られている。近年になり、Semaphorinファミリーの免疫系への関与 (Trends in Immunol. 22巻, 670-676頁, 2001年) や、臓器
5 発生・血管新生における関与が明らかになりつつある。Semaphorinファミリーに属するヒト由来のSemaphorin 3B、Semaphorin 3Fは、癌抑制遺伝子として報告されている (Proc. Natl Acad. Sci. USA 98巻, 13954-13959頁, 2001年、Cancer Res. 62巻, 542-546頁, 2002年、Cancer Res. 62巻, 2637-2643頁, 2002年)。ヒト
10 Semaphorin 3Cは、ヒト肺がん組織で発現が亢進しているという報告がある (J. Surg. Oncol. 72巻, 18-23頁, 1999年、Proc. Natl Acad. Sci. USA 94巻, 14713-14718頁, 1997年)。ヒトSemaphorin 3Eは転移性細胞で発現していると報告されている (Cancer Res. 58巻, 1238-1244頁, 1998年)。

ヒトSemaphorin 4B (以下、SEMA4Bと略すこともある; 配列番号: 1) は、ヒトSemaphorin4D (以下、SEMA4Dと略すこともある) とアミノ酸レベルで相同性が41
15 %であり、低酸素条件下で発現が上昇する遺伝子のひとつとして報告されている (WO 02/46465号公報)。また、ジーンチップ解析に基づきSEMA4Bなどを含む数百種の塩基配列が、肺癌の診断または肺癌を治療する化合物の探索などに使用できるとの報告もある (WO 02/86443号公報)。SEMA4Bとアミノ酸レベルで93%の相同性を有するNOV7は、癌で発現亢進していることが報告されている (WO 02/06329
20 号公報)。SEMA4Bなどと相同性60%以上を有するポリヌクレオチドやポリペプチドを用いる膀胱癌の診断法、抗体、膀胱癌関連タンパク質を調節する化合物のスクリーニングなどが、WO 03/003906号公報に報告されている。また、ヒトPlexinB1
25 (以下、PlexinB1と略することもある; GenBank: AB007867) のリガンドはSEMA4Dであること (Cell, 99巻, 71-80頁, 1999年)、およびPlexinB1はヒト肝細胞増殖因子 (HGF) 受容体と複合体を形成しており、SEMA4Dで刺激するとPlexinB1およびHGF受容体の両方がリン酸化され、細胞の増殖が促進されること (Nature Cell Biol. 4巻, 720頁-724頁, 2002年) が知られている。

癌細胞に特異的に発現する分子を標的とし、癌細胞の増殖阻害を誘導する安全な薬剤が切望されている。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、SEMA4Bと PlexinB1とが結合すること、両者の結合を阻害することにより癌細胞のアポトーシスが促進されること、SEMA4Bに対する抗体がSEMA4BとPlexinB1との結合を阻害することを見出した。この知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

〔1〕配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害する物質、

〔2〕物質が、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体である上記〔1〕記載の物質、

〔2a〕さらに、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩も認識する抗体である上記〔2〕記載の物質、

〔3〕物質が、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合によりもたらされる癌細胞増殖刺激を中和する活性を有する抗体である上記〔1〕記載の物質、

〔4〕抗体が、モノクローナル抗体である上記〔2〕または〔3〕記載の物質、

〔5〕上記〔1〕記載の物質を含有してなる癌の予防・治療剤、

〔6〕上記〔1〕記載の物質を含有してなる癌細胞のアポトーシス促進剤、

〔7〕上記〔1〕記載の物質を含有してなる癌細胞の増殖抑制剤、

〔8〕配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質を含有してなる癌細胞の増殖抑制剤、

〔8a〕配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質を含有してなる癌の予防・治療剤、

〔8b〕配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質を含有してなる癌細胞のアポトーシス促進剤、

〔9〕配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質、

〔9a〕配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を阻害する物質、

〔10〕物質が、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のリン酸化を阻害する活性を有する抗体である上記〔9〕記載の物質、

〔11〕抗体が、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合によりもたらされる癌細胞増殖刺激を中和する活性を有する抗体である上記〔10〕記載の物質、

〔12〕上記〔9〕記載の物質を含有してなる癌の予防・治療剤、

〔1 2 a〕 上記〔9 a〕 記載の物質を含有してなる癌の予防・治療剤、
〔1 3〕 上記〔9〕 記載の物質を含有してなる癌細胞のアポトーシス促進剤、
〔1 3 a〕 上記〔9 a〕 記載の物質を含有してなる癌細胞のアポトーシス促進剤、

5 〔1 4〕 上記〔9〕 記載の物質を含有してなる癌細胞の増殖抑制剤、
 〔1 4 a〕 上記〔9 a〕 記載の物質を含有してなる癌細胞の増殖抑制剤、
 〔1 4 b〕 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
 のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩をコ
10 ードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその
 一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる癌の予防・治療剤、

 〔1 4 c〕 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
 のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩をコ
15 ードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその
 一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる癌細胞のアポトー
 シス促進剤、

 〔1 4 d〕 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
 のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩をコ
20 ードするポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその
 一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる癌細胞の増殖抑制
 剤、

 〔1 5〕 (a) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10
 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する
 タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、および (b) 配列番号：26
25 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する
 タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、
 上記 (a) のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、上記 (b) の
 タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害する物質のス
 クリーニング方法、

〔16〕 (a) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、および (b) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記 (a) のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、上記 (b) のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害する物質のスクリーニング用キット、

10 〔16a〕 上記〔15〕記載のスクリーニング方法または上記〔16〕記載のスクリーニング用キットを用いて得られる物質、

〔16b〕 上記〔16a〕記載の物質を含有してなる癌の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤または癌細胞の増殖抑制剤、

15 〔17〕 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質のスクリーニング方法、

20 〔17a〕 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子を用いることを特徴とする、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を阻害する物質のスクリーニング方法、

25 〔18〕 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質のスクリーニング用キット、

〔18a〕 上記〔17〕記載のスクリーニング方法または上記〔18〕記載のスクリーニング用キットを用いて得られる物質、

〔18b〕 上記〔18a〕記載の物質を含有してなる癌の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤または癌細胞の増殖抑制剤、

〔19〕 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および（または）癌細胞の増殖抑制方法、

10 〔20〕 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いる上記〔19〕記載の方法、

15 〔21〕 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のリン酸化を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および（または）癌細胞の増殖抑制方法、

20 〔21a〕 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および（または）癌細胞の増殖抑制方法、

25 〔22〕 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いる上記〔21〕記載の方法、

〔22a〕 さらに、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩も認識する抗体である上記〔22〕記載の方法、

〔２２ｂ〕配列番号：１、配列番号：４、配列番号：７または配列番号：１０で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いる上記〔２１ａ〕記載の方法、

- ５ 〔２２ｃ〕さらに、配列番号：２６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩も認識する抗体である上記〔２２ｂ〕記載の方法、

- 〔２３〕哺乳動物に対して、上記〔１〕または〔９〕記載の物質の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および（または）癌細胞の増殖抑制方法、
- １０

- 〔２３ａ〕哺乳動物に対して、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：７または配列番号：１０で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および（または）癌細胞の増殖抑制方法、
- １５

〔２４〕癌の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤および（または）癌細胞の増殖抑制剤を製造するための、上記〔１〕または〔９〕記載の物質の使用、

- 〔２４ａ〕癌の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤および（または）癌細胞の増殖抑制剤を製造するための、配列番号：１、配列番号：４、配列番号：７または配列番号：１０で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質の使用などを提供する。
- ２０

発明を実施するための最良の形態

- ２５ 配列番号：１、配列番号：４、配列番号：７または配列番号：１０で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例、肝細胞、脾細胞、神経

細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、

5 滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、

10 前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であつてもよく、合成タンパク質であつてもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と95%以上、好ましくは約98%以上、

15 好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

20 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と99.9%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

25

配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と99.9%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号： 7 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号： 7 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号： 7 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 5 配列番号： 10 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号： 10 で表されるアミノ酸配列と 99.9%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 10 配列番号： 10 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号： 10 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号： 10 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 15 アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

- 20 上記の実質的に同質の活性としては、例えば（後述の）本発明で用いられるレセプター結合活性、本発明で用いられるレセプターのリン酸化誘導・促進活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、本発明で用いられるレセプター結合活性、本発明で用いられるレセプターのリン酸化誘導・促進活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 25 上記結合活性の測定は、自体公知の方法、例えばEIA法、免疫沈降法またはこれらに準じる方法に従って測定することができる。具体的には、本発明で用いられるタンパク質および本発明で用いられるレセプターのそれぞれを、タグを付加した組換え型タンパク質として動物細胞で発現させる。該タグとしては、FLAG、His、V5、myc、HAなどが用いられ、本発明で用いられるタンパク質に付加するタグ（

タグA)と、本発明で用いられるレセプターに付加するタグ(タグB)とは異なるものを用いる。タグBに対する抗体で、上記タグA付加タンパク質および上記タグB付加レセプターの混合液を免疫沈降し、得られた沈殿物を、タグAに対する抗体を用いてウェスタンブロッティング操作を行うことにより、本発明で用い

5 られるレセプターに結合した本発明で用いられるタンパク質の量を測定することができる。

上記リン酸化誘導・促進活性の測定は、自体公知の方法、例えばMethods in Enzymology 200巻、98頁-107頁、1991年に記載の方法またはそれに準じた方法に従って測定する。具体的には、例えばタグ(例、FLAG、His、V5、myc、HAなど)

10 をC末端に付加した本発明で用いられるレセプターを、組換え型タンパク質として動物細胞に発現させ、本発明で用いられるタンパク質と反応させた後、細胞を破碎し、無細胞抽出液を調製し、抗タグ抗体で免疫沈降し、リン酸化された本発明で用いられるレセプターの生成量は、抗リン酸化チロシン抗体などを用いて公知の方法(例、ウェスタンブロット法など)により測定することができる。

15 本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、(1) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1~50個程度、好ましくは1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1~50個程度、好ましくは1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1~50個程度、好ましくは1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または

20 2個以上(例えば1~50個程度、好ましくは1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(2) (i) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列中の1または2個のアミノ酸

25

- が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列に1または2個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列中の1または2個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。
- 5 上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。
- 10 本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。
- 15 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明で用いられるレセプターと称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、
- 20
- 25

筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

5 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

10 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

15 上記の実質的に同質の活性としては、例えば本発明で用いられるタンパク質結合活性、リン酸化される活性（例、本発明のタンパク質の刺激によりリン酸化される活性など）などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、上記の活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

20 リン酸化される活性の測定は、自体公知の方法、例えばMethods in Enzymology 200巻、98頁～107頁、1991年に記載の方法またはそれに準じた方法に従って測定する。具体的には、例えば、タグ（例、FLAG、His、V5、myc、HAなど）をC末端に付加した本発明で用いられるレセプターを、組換え型タンパク質として動物細胞
25 に発現させ、本発明で用いられるタンパク質と反応させた後、細胞を破碎し、無細胞抽出液を調製し、抗タグ抗体で免疫沈降する。リン酸化された本発明で用いられるレセプターの生成量は、抗リン酸化チロシン抗体などを用いて公知の方法（例、ウェスタンブロット法など）により定量することができる。

本発明で用いられるレセプターとしては、例えば、(i) 配列番号：26で表さ

れるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ii）配列番号：26で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（iii）配列番号：26で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、（iv）配列番号：26で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

本発明で用いられるレセプターの具体例としては、例えば、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

また、本発明で用いられるレセプターは、肝細胞増殖因子（HGF）受容体と複合体を形成していてもよい。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。本発明で用いられるタンパク質およびレセプターは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基など

のC₇₋₁₄アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステル

5 としては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内

10 のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

15 本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの部分ペプチド（本発明で用いられる部分ペプチド）としては、前記した本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質またはレセプターと同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

20 例えば、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、上記部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに

25

好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは１～５個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

- 5 また、本発明で用いられる部分ペプチドはＣ末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

- さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、Ｃ末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、Ｎ末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。
- 10

- 15 本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

- 本発明で用いられるタンパク質もしくはレセプターまたは部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタン
- 20
- スルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 本発明で用いられるタンパク質もしくはレセプター、またはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。
- 25

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織ま

たは細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができ、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化

水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20 \sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 $1.5 \sim 4$ 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ C_{1-6} ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられ

る。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz* 1、*Cl*₂-*Bz* 1、2-ニトロベンジル、*Br*-*Z*、*t*-ブチルなどが用いられる。

- 5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*To* s、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベンジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられる。

- 10 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、*HOBT*）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 15 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd*-黒あるいは*Pd*-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフォイド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。
- 25

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

- タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、
- 5 まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることが
- 10 できる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

- 20 本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分と
- 25 を縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(i)～(v)に記載された方法が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(ii) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205
5、(1977年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラ
フィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられ
る部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチド
10 が遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩
に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれ
に準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述
した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであれ
15 ばいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲ
ノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、
前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい
。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コス
20 ミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より
total RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接 Reverse
Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)
によって増幅することもできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、
25 (i) 配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で
表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配
列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質
的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(ii) 配列番号：5で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：5

で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(iii) 配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：8

- 5 5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(iv) 配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：

- 11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする
10 塩基配列を含有し、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

- 配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と95
15 %以上、好ましくは約98以上、好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：5で表される塩基配列と99.9%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 20 配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：8で表される塩基配列と99.9%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 配列番号：11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：11で表される塩基配列と
25 99.9%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる

。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19～40 mM、好ましくは約 19～20 mMで、温度が約 50～70℃、好ましくは約 60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mMで温度が約 65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、(i) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：3 で表される塩基配列を含有する DNA などが、(ii) 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：5 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：6 で表される塩基配列を含有する DNA などが、(iii) 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：8 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：9 で表される塩基配列を含有する DNA などが、(iv) 配列番号：10 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号：11 で表される塩基配列を含有する DNA または配列番号：12 で表される塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8 または配列番号：11 で表される塩基配列を含有する DNA の一部分を有する DNA、または配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8 または配列番号：11 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする DNA の一部分を含有する DNA などが用いられる。

配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

- 5 本発明で用いられるレセプターをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるレセプターをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい
- 10 。

- ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)
- 15 によって増幅することもできる。

- 本発明で用いられるレセプターをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：35で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：35で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAなどが挙げられる。
- 20

- 配列番号：35で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：35で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 25

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる

。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mMで、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mMで温度が約 65 °Cの場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：35で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質またはレセプター、部分ペプチド（以下、これら

10 らをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

15 20

DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (Takara Bio (株))、MutanTM-K (Takara Bio (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

25 クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAア

ダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺

伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

- 5 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN
 端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、
 OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラー
 10 ゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合
 には、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞であ
 る場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配
 列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

- 15 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、
 昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)] , JM103 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)] , JA221 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)] , HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)] , C600 [Genetics, 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [Gene, 24巻, 255(1983)] , 207-21 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

- 25 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由

来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell ; Sf細胞) 、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞 ; B m N細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711) 、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature) , 315巻, 592 (1985)] 。

10 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記) , dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記) , マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, マウスATDC5細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

15 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110 (1972) やGene, 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

20 酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187 (1991) 、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

25 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール. 263-267 (1995) (秀潤社発行) 、Virology, 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

10 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

15 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

20 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

25 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5
～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [Science, 122巻, 501(1952)] , DME
M培地 [Virology, 8巻, 396(1959)] , RPMI 1640培地 [The Journal of the
5 Society for the Biological Medicine, 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pH
は約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～60時間
行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタン
パク質を生成せしめることができる。

10 上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法
により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後
、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波
、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した
15 のち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いら
れる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン
X-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が
分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上
清とを分離し、上清を集める。

20 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の
精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。こ
れらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する
方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲ
ル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグ
25 ラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーな
どの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水
性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法など
が用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あ

るいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

5 なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

10 かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウェスタンブロッティングなどにより測定することができる。

「配列番号：１、配列番号：４、配列番号：７または配列番号：１０で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（本発明で用いられるタンパク質）と、配列番号：２６で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（本発明で用いられるレセプター）との結合を阻害する物質」としては、本発明で用いられるタンパク質と本発明で用いられるレセプターとの結合を阻害する物質（例、抗体、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液など）であればいずれでもよく、例えば、
20 本発明で用いられるタンパク質に特異的に反応する抗体、本発明で用いられるレセプターに特異的に反応する抗体、本発明で用いられるタンパク質および本発明で用いられるレセプターに特異的に反応する二重特異性抗体、本発明で用いられるレセプターの活性（例、本発明で用いられるタンパク質結合活性、リン酸化される活性など）を阻害する抗体、本発明で用いられるタンパク質の活性（例、
25 本発明で用いられるレセプター結合活性、本発明で用いられるレセプターのリン酸化誘導・促進活性など）を阻害する抗体（以下、これらをまとめて本発明の抗体と称することもある）などが挙げられる。

「本発明で用いられるタンパク質の活性を阻害する物質」としては、本発明で用いられるタンパク質の活性（例、本発明で用いられるレセプター結合活性、本

発明で用いられるレセプターのリン酸化誘導・促進活性など）を阻害する物質（例、抗体、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液など）であればいずれでもよく、例えば、本発明の抗体などが挙げられる。

- 5 「本発明で用いられるレセプターの活性を阻害する物質」としては、本発明で用いられるレセプターの活性（例、本発明で用いられるタンパク質結合活性、リン酸化される活性など）を阻害する物質（例、抗体、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液など）であればいずれでもよく、例えば、本発明の抗体などが挙げられる。
- 10

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

- 本発明の抗体として好ましくは、本発明で用いられるタンパク質と本発明で用いられるレセプターとの結合によりもたらされる癌細胞増殖刺激を中和する活性を有する抗体（中和活性抗体）である。または、本発明で用いられるレセプターの活性（好ましくは、リン酸化される活性など）を阻害する抗体である。さらに好ましくは、モノクローナル抗体である。
- 15

以下に、本発明の抗体の抗原の調製法、および該抗体の製造法について説明する。

20 (1) 抗原の調製

- 本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と同一の抗原決定基を1種あるいは2種以上有する（合成）ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単に本発明の抗原と称することもある）。
- 25

上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、後述の参考例や公知の方法に準じて製造でき、さらに、(a) 例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の組織または細胞から公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用い

て調製、(b) ペプチド・シンセサイザー等を使用する公知のペプチド合成方法で化学的に合成、(c) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって

5 も製造される。

(a) 該哺乳動物の組織または細胞から本発明の抗原を調製する場合、その組織または細胞をホモジナイズした後、粗分画物（例、膜画分、可溶性画分）をそのまま抗原として用いることもできる。あるいは酸、界面活性剤またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、

10 、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することもできる。

(b) 化学的に本発明の抗原を調製する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述の(a)の方法を用いて天然材料より精製した本発明の抗原と同一の構造を有するもの、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、

15 または配列番号：26で表されるアミノ酸配列において3個以上、好ましくは6個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチドなどが用いられる。

(c) DNAを含有する形質転換体を用いて配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を

20 含有するタンパク質またはその塩を製造する場合、該DNAは、公知のクローニング方法〔例えば、Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法など〕に従って作製することができる。該クローニング方法とは、(1) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有する

25 タンパク質またはその塩のアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または(2) 配列番号：1、配列番

- 号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法により配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩をコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法などが挙げられる。

- 本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを発現する哺乳動物細胞自体を、本発明の抗原として直接用いることもできる。哺乳動物細胞としては、上記(a)項で述べたような天然の細胞、上記(c)項で述べたような方法で形質転換した細胞などを用いることができる。形質転換に用いる宿主としては、ヒト、サル、ラット、マウス、ハムスターなどから採取した細胞であれば何れのものでも良く、HEK293、COS7、CHO-K1、NIH3T3、Balb3T3、FM3A、L929、SP2/0、P3U1、B16、またはP388などが好ましく用いられる。本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを発現する天然の哺乳動物細胞または形質転換した哺乳動物細胞は、組織培養に用いられる培地(例、RPMI1640)または緩衝液(例、Hanks' Balanced Salt Solution)に懸濁された状態で免疫動物に注射することができる。免疫方法としては、抗体産生を促すことのできる方法であれば何れの方法でも良く、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射または皮下注射などが好ましく用いられる。

- 本発明の抗原としてのペプチドは、(1)公知のペプチドの合成法に従って、または(2)配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することもできる。

- 該ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下に記載された方法等が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966年)

(ii) SchroederおよびLuebke、The Peptide, Academic Press, New York (1965年)

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製
5 単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシ
10 シメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノ
15 キシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはクロロトリチル樹脂、オキシム樹脂、4-ヒドロキシ安息香酸系樹脂等を用い、部
20 分的に保護したペプチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができ、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-
25 N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObtなど)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ

酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。

- 5 反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～約50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常約1.5ないし約4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないように
10 することができる。

- 原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシルおよびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。
20
25

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C₁₋₆)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベン

ジロキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBz、Cbz、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

- 5 ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチド
- 10 を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

- 15 ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

- 20 本発明の抗原は、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、本発明の抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体（キャリアー）と本発明の抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合あるいは吸着させた本発明の抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。天然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリン
- 25 ペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または共重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN, N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル (SPDP) など）を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

(2) モノクローナル抗体の作製

本発明の抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈内注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウスが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、本発明の抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、本発明の抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の本発明の抗体の抗体価の測定は、例えば本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを放射性物質または酵素などで標識し、抗血清と反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 [Nature、256巻、495頁 (1975年

）に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髓腫細胞としては、例えばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられ、P3U1などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓細胞数との好ましい比率は、通常1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、通常20～40℃、好ましくは30～37℃、通常1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

本発明の抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用でき、例えば配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩あるいはそれらの部分ペプチドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した本発明の抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを加え、固相に結合した本発明の抗体を検出する方法などがあげられる。本発明の抗体のスクリーニング、育種は、通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎仔血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎仔血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5％炭酸ガス下で行なうことができる。

本発明の抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免

疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAまたはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など〕に従って行われる。

以上のようにして、ハイブリドーマ細胞を温血動物の生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から抗体を採取することによって、本発明の抗体を製造することができる。

10 (a) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7もしくは配列番号：10、または配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質の一部領域と反応する本発明の抗体を産生するハイブリドーマ、および (b) 上記タンパク質とは反応するが、その一部領域とは反応しない本発明の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは、例えば、その一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

15 本発明で用いられるタンパク質および本発明で用いられるレセプターに特異的に反応する二重特異性モノクローナル抗体は、公知の方法に準じて製造することができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

20 本発明のポリクローナル抗体は、自体公知またはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原自体、またはそれとキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

25 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアータンパク質とハプテンとの混合比は、キャリアータンパク質に架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもく、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合で架橋させる

方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアタンパク質の架橋には、種々の縮合剤を用いることができ、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

- 5 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位に、それ自体または担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

- ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、
10 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、例えば上記(2)で述べたハイブリドーマ培養上清の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 15 本発明で用いられるタンパク質もしくはレセプターまたはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(例、DNA(以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを、本発明のDNAと略記する場合がある))の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のポリヌクレオチド(例
20 、DNA)の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよく、アンチセンスDNAが好ましい。

- 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに
25 相補的な塩基配列(すなわち、本発明のDNAの相補鎖)の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、(イ)翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位を

コードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約 70%以上、好ましくは約 80%以上、より好ましくは約 90%以上、最も好ましくは約 95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、（ロ）RNAseHによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約 70%以上、好ましくは約 80%以上、より好ましくは約 90%以上、最も好ましくは約 95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：35で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12または配列番号：35で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12または配列番号：35で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできる該遺伝子に対応するアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明の

5 タンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることが

10 できるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とタンパク質との間で「対応する」とは、ヌクレ

15 オチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される（指令にある）タンパク質のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パンドローム領域または3'端ヘアピンループなどは、好ましい対象領域として

20 選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係については、目的核酸が対象領域とハイブリダイズすることができる場合は、その目的核酸は、当該対象領域のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-

25 リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出さ

れるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する) などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであつてもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーリジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であつてもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであつてよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNAまたは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体、チオホスフェート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものなどが挙げられる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、以下のように設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスポリヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスポリヌクレオ

チドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、また、もし毒性があるような場合はアンチセンスポリヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。このような修飾は、例えばPharm Tech Japan, 8巻, 247頁または395頁, 1992年、Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993年などで数多く報告されている。

5 本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基

10 骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端または5'

15 ' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端または5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の

20 基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンスポリヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、または本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

25 以下に、(a) 本発明で用いられるタンパク質と本発明で用いられるレセプターとの結合を阻害する物質、(b) 本発明で用いられるタンパク質の活性を阻害する物質、(c) 本発明で用いられるレセプターの活性を阻害する物質、(d) 本発明の抗体、(e) 本発明のアンチセンスポリヌクレオチドなどの用途を説明する。

〔1〕 癌の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤

本発明で用いられるタンパク質は癌組織で発現が増加し、本発明で用いられるレセプターと結合する。本発明で用いられるタンパク質および本発明で用いられるレセプターは、癌細胞（例、ヒト肺癌細胞など）で同時に発現しているので、本発明で用いられるレセプターによって誘導される浸潤能の亢進を伴った細胞増殖促進が自己完結的に起こり（オートクライン増殖促進）、癌の進展・悪性化に寄与している。本発明で用いられるレセプターは、本発明で用いられるタンパク質が結合することによって活性化（例、リン酸化）され、活性化に至るメカニズムには、例えば肝細胞増殖因子（HGF）受容体などのチロシンキナーゼが関与する。上記のような癌細胞の増殖促進現象は、例えば（i）本発明で用いられるタンパク質と本発明で用いられるレセプターとの結合、（ii）本発明で用いられるタンパク質の活性（本発明で用いられるレセプターのリン酸化誘導・促進活性、本発明で用いられるレセプター結合活性など）、（iii）本発明で用いられるレセプターの活性化誘導（例、リン酸化される活性誘導・促進など）などを阻害することにより消失する。また、本発明の抗体、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、癌細胞のアポトーシス誘導・促進作用、増殖抑制作用などを有する。本発明の抗体、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドが本発明で用いられるタンパク質に結合し、該タンパク質の発現を阻害することにより、癌細胞は増殖が抑制され、アポトーシスが誘導・促進される。

従って、（a）本発明で用いられるタンパク質と本発明で用いられるレセプターとの結合を阻害する物質、（b）本発明で用いられるタンパク質の活性を阻害する物質、（c）本発明で用いられるレセプターの活性を阻害する物質、（d）本発明の抗体（その塩も含む）または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドなどを含有する医薬は、低毒性で安全な、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巢癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などの医薬として使用することができる。

本発明の抗体または上記物質を含有する上記剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラッ

ト、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、血管内投与、腹腔内投与、皮下投与など）に投与することができる。

5 本発明の抗体または上記物質は、それ自体を投与しても良いし、または適当な医薬組成物として投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の抗体または上記物質と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであっても良い。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

10 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、ワクチン等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調整できる。注射剤の調整方法としては、例えば、本発明の抗体または上記物質を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ
15 糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil）〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶
20 解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、本発明の抗体または上記物質を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

25 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

なお前記した各組成物は、上記抗体または物質との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。抗体または物質の含有量としては、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体または物質が含有されていることが好ましい。

上記の剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なり、例えば、成人の乳癌の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体または物質を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

さらに、本発明の抗体および上記物質は、他の薬剤、例えばアルキル化剤（例、サイクロフォスファミド、イフォスファミド等）、代謝拮抗剤（例、メソトレキセート、5-フルオロウラシル等）、抗癌性抗生物質（例、マイトマイシン、アドリアマイシン等）、植物由来抗癌剤（例、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール等）、シスプラチン、カルボプラチン、エトポキシドなどと併用してもよい。本発明の抗体または上記物質および上記薬剤は、同時または異なった時間に、患者に投与すればよい。

〔2〕本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの定量

本発明の抗体を用いることにより、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの測定または組織染色などによる検出を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子のF(ab')₂、Fab'またはFab画分などを用いてもよい。

本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明で用いられるタンパク質またはレセプター量）に対

応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、サンドイッチ法、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリーなどが用いられるが、感度、特異性の点で後述するサンドイッチ法、競合法が、特にサンドイッチ法が好ましい。

(1) サンドイッチ法

サンドイッチ法においては、不溶化した本発明の抗体に被検液を反応（１次反応）させ、さらに標識化された本発明の抗体を反応（２次反応）させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの量を定量することができる。１次反応と２次反応は同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターのＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

(2) 競合法

本発明の抗体、被検液および標識化された本発明で用いられるタンパク質またはレセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの割合を測定することにより、被検液中の本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを定量する。

本反応法は、例えば、固相化法を用いて行う。

具体例としては、抗マウスIgG抗体（ICN/CAPPEL社製）を固相化抗体として用い、この固相化抗体の存在するプレートに、(i) 本発明の抗体、(ii) HRPで標識化された本発明で用いられるタンパク質またはレセプター、および (iii) 被検液を添加し、反応後、固相に吸着したHRP活性を測定し、本発明で用いられるタンパ

ク質またはレセプターを定量する。

(3) イムノメトリック法

- イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化された本発明の抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは
- 5 被検液中の抗原と過剰量の標識化された本発明の抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化された本発明の抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

(4) ネフロメトリー

- 10 ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

- 上記(1)～(4)において、標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ランタニド元素などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが、酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが、蛍光物質としては、例えばシアニン蛍光色素
- 15 素(例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7(アマシャムバイオサイエンス社製)など)、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

- 25 抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂あるいはガラスなどが挙げられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる

- 5 [例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (10 Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques(Part 15 I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。したがって、本発明のサンドイッチ免疫測定法などによる測定系を構築する場合、その方法は後述する実施例に限定されない。

- 以上のように、本発明の抗体は、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを感度良く定量することができるので、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの生理機能のさらなる解明、および本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの関与する疾患の診断に有用である。具体的には、本発明の抗体を用いて、組織中や体液中(血液、血漿、血清、尿など)に含まれる本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの量を測定することにより、例えば、癌(例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など)などを診断することができる。

[3] 疾病に対する医薬候補物のスクリーニング

本発明で用いられるタンパク質は癌組織で発現が増加し、また、本発明で用いられるレセプターと結合する。本発明で用いられるタンパク質および本発明で用

いられるレセプターは、癌細胞（例、ヒト肺癌細胞など）で同時に発現している
ので、本発明で用いられるレセプターによって誘導される浸潤能の亢進を伴った
細胞増殖促進が自己完結的に起こり（オートクライン増殖促進）、癌の進展・悪
性化に寄与している。本発明で用いられるレセプターは、本発明で用いられるタ
ンパク質が結合することによって活性化（例、リン酸化）され、活性化に至るメ
カニズムには、例えば肝細胞増殖因子（HGF）受容体などのチロシンキナーゼが関
与する。上記のような癌細胞の増殖促進現象は、例えば（i）本発明で用いられる
タンパク質と本発明で用いられるレセプターとの結合、（ii）本発明で用いられ
るタンパク質の活性（本発明で用いられるレセプターのリン酸化誘導・促進活性
、本発明で用いられるレセプター結合活性など）、（iii）本発明で用いられるレ
セプターの活性化誘導（例、リン酸化される活性誘導・促進など）などを阻害す
ることにより消失し、癌細胞の増殖阻害が起こりアポトーシスが誘導される。

従って、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの活性を阻害する化
合物またはその塩は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、
胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状
腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス
促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などとして使用することができる。

したがって、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターは、本発明のタ
ンパク質またはレセプターの活性を阻害する物質のスクリーニングのための試薬
として、それぞれ有用である。

すなわち、本発明は、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを用い
ることを特徴とする、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの活性を
阻害する物質のスクリーニング方法を提供する。

本発明で用いられるタンパク質の活性（例、本発明で用いられるレセプター結
合活性など）を阻害する物質のスクリーニング方法としては、例えば、本発明の
タンパク質および本発明で用いられるレセプターのそれぞれを、タグを付加した
組換え型タンパク質として動物細胞で発現させる。該タグとしては、FLAG、His
、V5、myc、HAなどが用いられ、本発明のタンパク質に付加するタグ（タグA）と
、本発明で用いられるレセプターに付加するタグ（タグB）とは異なるものを用

いる。タグBに対する抗体で、(i) 上記タグA付加タンパク質および上記タグB付加レセプターの混合液、または(ii) 試験化合物、上記タグA付加タンパク質および上記タグB付加レセプターの混合液をそれぞれ免疫沈降し、得られた沈殿物を、タグAに対する抗体を用いてウェスタンブロッティング操作を行うことにより、本発明で用いられるレセプターに結合した本発明で用いられるタンパク質の量をそれぞれ測定し、上記(i)の場合と(ii)の場合とで比較する。

本発明で用いられるタンパク質の活性(例、本発明で用いられるレセプターのリン酸化誘導・促進活性など)を阻害する物質のスクリーニング方法としては、例えば、タグ(例、FLAG、His、V5、myc、HAなど)をC末端に付加した本発明で用いられるレセプターを組換え型タンパク質として動物細胞に発現させ、(i) 本発明で用いられるタンパク質、または(ii) 試験化合物および本発明で用いられるタンパク質と、それぞれ反応させた後、細胞を破碎し、無細胞抽出液を調製し、抗タグ抗体で免疫沈降し、リン酸化された本発明で用いられるレセプターの生成量を、抗リン酸化チロシン抗体などを用いて公知の方法(例、ウェスタンブロット法など)により測定し、上記(i)の場合と(ii)の場合とで比較する。リン酸化誘導・促進活性は、自体公知の方法、例えばMethods in Enzymology 200巻、98頁-107頁、1991年に記載の方法またはそれに準じた方法に従って行えばよい。

例えば、上記(ii)の場合における本発明で用いられるタンパク質の活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明で用いられるタンパク質の活性を阻害する物質として選択することができる。

本発明で用いられるレセプターの活性(例、リン酸化される活性など)を阻害する物質のスクリーニング方法の具体例としては、例えば、タグ(例、FLAG、His、V5、myc、HAなど)をC末端に付加した本発明で用いられるレセプターを、組換え型タンパク質として動物細胞に発現させ、(i') 本発明で用いられるタンパク質、または(ii') 本発明で用いられるタンパク質および試験化合物と、それぞれ反応させた後、細胞を破碎し、無細胞抽出液を調製し、抗タグ抗体で免疫沈降し、リン酸化された本発明で用いられるレセプターの生成量を、抗リン酸化チロシン抗体などを用いて公知の方法(例、ウェスタンブロット法など)により定量し

、上記 (i') の場合と (ii') の場合とで比較する。

例えば、上記 (ii') の場合における本発明で用いられるレセプターの活性を、上記 (i') の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害させる試験化合物を、本発明で用いられるレセプターの活性を阻害する化合物として選択することができる。

上記の本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを産生する能力を有する細胞としては、例えば、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードする DNA を含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS 7 細胞、CHO 細胞、HEK 293 細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質の遺伝子も、癌組織において発現が増加するので、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの遺伝子の発現を阻害する物質も、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などとして使用することができる。

したがって、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

スクリーニング方法としては、(iii) 本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを産生する能力を有する

細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

- 上記方法において、(iii) と (iv) の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明で用いられるタンパク質またはレセプター量または本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードする mRNA 量）を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

- タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明の抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA 法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- mRNA 量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11 または配列番号：35 で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11 または配列番号：35 で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いる PCR 法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- 例えば、上記 (iv) の場合における遺伝子の発現を、上記 (iii) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害させる試験化合物を、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの遺伝子の発現を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質またはレセプター、または本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを産生する能力を有する細胞などを含有する。

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる物質は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれる。

該塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる物質を上記の剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 例えば、経口投与または非経口投与のための組成物としては、上記〔1〕で記載した組成物と同様のものが挙げられ、同様に製造でき、同様に使用できる。

〔4〕遺伝子診断薬

- 本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明で用いられるタンパク質またはレセプターまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

- 上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874～879頁（1989年）、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

- 例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異などが検出された場合は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）である可能性が高いと診断することができる。

〔5〕アンチセンスポリヌクレオチド含有医薬

- 本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、本発明で用いられるタンパク質またはレセプター、それをコードするDNAの生体内における機能や作用を抑制し、癌細胞のアポトーシスを誘導することができるので、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍

など)の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の剤などとして使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

- 5 また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。
- 10

- さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポソームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下等に投与してもよい。
- 15

- 該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。
- 20

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

- 上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質またはレセプター、またはそれをコードするDNAの機能を抑制することができるので
- 25

、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などとして使用することができる。

- 5 二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

- 10 上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

- 15 [6] 本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを含有する医薬

本発明で用いられるタンパク質は癌で過剰に発現しており、本発明で用いられるレセプターも癌細胞で発現していることから、癌患者の免疫系を活性化するために本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを癌ワクチンとして用いることもできる。

- 20 例えば、強力な抗原提示細胞（例、樹状細胞）を本発明で用いられるタンパク質またはレセプター存在下培養し、該タンパク質を貪食させた後に、再び患者の体内に戻す、所謂養子免疫療法などを好ましく適用し得る。体内に戻された樹状細胞は癌抗原特異的な細胞障害性T細胞を誘導、活性化することにより癌細胞を死滅させることが可能である。

- 25 また、本発明のタンパク質またはレセプターは、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防または治療のためのワクチン製剤として、安全に、哺乳動物（例、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ブタ）に投与することもできる。

該ワクチン製剤は、通常、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターおよび生理学的に許容されうる担体を含む。担体としては例えば、水、食塩水（生理食塩水を含む）、緩衝液（例、リン酸緩衝液）、アルコール（例、エタノール）などの液体の担体があげられる。

- 5 ワクチン製剤は、通常のワクチン製剤の製造方法に従って調製することができる。

通常、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターは、生理学的に許容されうる担体に溶解または懸濁される。また、本発明で用いられるタンパク質と生理学的に許容されうる担体とを別々に調製し、用時それらを混合して用いてもよい。

10

ワクチン製剤には、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターおよび生理学的に許容されうる担体に加え、アジュバント（例、水酸化アルミニウムゲル、血清アルブミンなど）、防腐剤（例、チメロサルなど）、無痛化剤（例、ブドウ糖、ベンジルアルコールなど）などを配合させてもよい。また、本発明で用

15 いられるタンパク質またはレセプターに対する抗体産生を促進させるために、例えばサイトカイン（例、インターロイキン-2などのインターロイキン類、インターフェロン- γ などのインターフェロン類など）をさらに配合させてもよい。

15

ワクチン製剤として用いる際、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターは活性体として用いてもよいが、抗原性を高めるために変性させてもよい。変

20 性は、通常、加熱処理、タンパク質変性剤（例、ホルマリン、塩酸グアニジン、尿素）による処理により行われる。

20

得られたワクチン製剤は低毒性であり、通常注射剤として、例えば皮下、皮内、筋肉内に投与してもよく、また癌細胞塊またはその近傍に局所的に投与してもよい。

25

本発明で用いられるタンパク質またはレセプターの投与量は、例えば対象疾患、投与対象、投与ルートなどによって異なるが、例えば本発明で用いられるタンパク質またはレセプターを癌に罹患した成人（体重60kg）に皮下的に注射剤として投与する場合、1回当たり通常0.1~300mg程度、好ましくは100~300mg程度である。ワクチン製剤の投与回数は1回でもよいが、抗体産生量を高めるために、約2

週間～約6ヶ月の間隔をあけて、該ワクチン製剤を2～4回投与することもできる。

〔7〕 DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（
5 本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- 10 (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始
15 原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに
20 目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ
25 、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例

えば、Wistar, SDなど) などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA
5 ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味
10 し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNA
15 Aコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明
20 のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。
25

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、J

Cウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来するDNAのプロモーター、 (ii) 各種哺乳動物 (ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、
 5 筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ (一般にTie2と略される)、
 10 ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素 (Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原 (H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、
 15 ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子
 20 1 α (EF-1 α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列 (一般にターミネターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用
 25 いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスーパーライジングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の

3' 下流 に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

- 10 該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

- 15 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

- 20 本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

- 25 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄

の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

5 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

10 また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

15 一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞
20 の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

25 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発

明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

- 5 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活性型
10 不応症に対する予防・治療剤、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例
15 えば、

(i) 組織培養のための細胞源としての使用、

(ii) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性について
20 の解析、

(iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(iv) 上記 (iii) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

25 (v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患によ

る二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク

5 質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうた

10 めに、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

〔8〕ノックアウト動物

15 本発明は、本発明で用いられるタンパク質またはレセプターをコードするDNA（本発明のDNA）が不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 20 (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- 25 (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
(9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および
(10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進
5 または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現
10 能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させる
15 ことによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体
20 例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、
25 あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について

本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を
5 選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans とKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的
10 背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に
15 加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用する
20 が、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。
25 この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能で

あり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1~10000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり[M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature、第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、
- 5 該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテ
- 10 ロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

- また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の
- 15 不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

〔8 a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに
- 20 起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば癌などに対して治療・予防効果を有する化
- 25 合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿など

があげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と癌の発症度合いの違いや癌の治癒度合いの違いを上記組織で経時的に観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

- 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、

プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- 5 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 10 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する
15 場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

〔8 b〕 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

- 20 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 25 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

- 5 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

- 10 例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損
- 15 マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。
- 20

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

- 25 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、

安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の阻害、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 10 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 15 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 20 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

25 このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の

原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

- 10 本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
15	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
20	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
25	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン

	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
5	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
10	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
15	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
20	p G l u	: ピログルタミン酸
	S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)
また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。		
	M e	: メチル基
25	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルフォニル

	CHO	: ホルミル
	Bz l	: ベンジル
	Cl ₂ -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
5	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル
10	Tr t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
	Fm o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HO B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HO O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
15		1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

20 SEMA 4 B のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する SEMA 4 B をコードする DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：3]

25 SEMA 4 B をコードする全長遺伝子を含む DNA の塩基配列を示す。

[配列番号：4]

SEMA 4 B-M1 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：5]

配列番号：4 で表されるアミノ酸配列を有する SEMA 4 B-M1 をコードす

るDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

SEMA4B-M1をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

- 5 SEMA4B-M2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕

配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有するSEMA4B-M2をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

- 10 SEMA4B-M2をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

SEMA4B-M3のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

- 15 配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有するSEMA4B-M3をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

SEMA4B-M3をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

- 20 参考例2、参考例3、参考例15および参考例16で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

参考例2、参考例3、参考例15および参考例16で用いられたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

- 25 参考例3で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

参考例3で用いられたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

参考例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：18]

参考例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：19]

参考例4、参考例6および参考例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す

5 。

[配列番号：20]

参考例4および参考例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：21]

参考例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

10 [配列番号：22]

参考例8で用いられたペプチド1のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：23]

参考例8で用いられたペプチド2のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：24]

15 参考例8で用いられたペプチド3のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：25]

参考例8で用いられたペプチド4のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：26]

PlexinB1のアミノ酸配列を示す。

20 [配列番号：27]

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：28]

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：29]

25 実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：30]

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：31]

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：32]

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：33]

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：34]

実施例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：35]

PlexinB1をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：36]

10 実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：37]

実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：38]

実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

15 後述の参考例4で得られた形質転換体*Escherichia coli*

TOP10/SEMA4B-M1/pCR4-TOP0は、2003年3月4日から茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8316として寄託されている。

後述の参考例4で得られた形質転換体*Escherichia coli*

20 TOP10/SEMA4B-M2/pCR4-TOP0は、2003年3月4日から茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8317として寄託されている。

後述の参考例4で得られた形質転換体*Escherichia coli*

25 TOP10/SEMA4B-M3/pCR4-TOP0は、2003年3月4日から茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8318として寄託されている。

以下において、参考例および実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1

遺伝子発現解析

肺がん組織で特異的に発現亢進している遺伝子群を明らかにするため、肺がん組織4例、正常肺組織5例から抽出されたtotal RNA（表1）を材料とし、oligonucleotide microarray（Human Genome U95A, U95B, U95C, U95D, U95E; Affymetrix社）を用いて遺伝子発現解析を行った。実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書（Expression analysis technical manual）に従った。

その結果、肺がん組織3例（lot. 0011-192-01285、lot. 0011-192-01293およびlot. 0011-192-01297）において、Semaphorin 4B（SEMA4B）および後述の参考例4記載のSemaphorin 4B-M1（SEMA4B-M1）、Semaphorin 4B-M2（SEMA4B-M2）ならびにSemaphorin 4B-M3（SEMA4B-M3）遺伝子の発現亢進が検出された（表2）。

〔表1〕

	RNAを抽出した組織	販売元
15	肺がん組織（lot. 0009-192-00122）	BioClinical Partners 社
	肺がん組織（lot. 0011-192-01285）	BioClinical Partners 社
	肺がん組織（lot. 0011-192-01293）	BioClinical Partners 社
	肺がん組織（lot. 0011-192-01297）	BioClinical Partners 社
	正常肺組織（lot. 0009-192-00150）	BioClinical Partners 社
20	正常肺組織（lot. 0009-192-00168）	BioClinical Partners 社
	正常肺組織（lot. 0011-192-01283）	BioClinical Partners 社
	正常肺組織（lot. 0011-192-01285）	BioClinical Partners 社
	正常肺組織（lot. 0011-192-01297）	BioClinical Partners 社

〔表 2〕

	組織	遺伝子発現量
	肺がん組織 (lot. 0009-192-00122)	ND
5	肺がん組織 (lot. 0011-192-01285)	10
	肺がん組織 (lot. 0011-192-01293)	9.5
	肺がん組織 (lot. 0011-192-01297)	1.9
	正常肺組織 (lot. 0009-192-00150)	ND
	正常肺組織 (lot. 0009-192-00168)	ND
10	正常肺組織 (lot. 0011-192-01283)	ND
	正常肺組織 (lot. 0011-192-01285)	ND
	正常肺組織 (lot. 0011-192-01297)	ND

遺伝子発現量は、oligonucleotide microarrayで発現が検出された全遺伝子の発現量の中央値を1として標準化した。

15 ND; not detected

参考例 2

ヒト肺癌細胞株のアポトーシス誘発

SEMA4Bおよび後述の参考例 4 記載のSEMA4B-M1、SEMA4B-M2ならびにSEMA4B-M3
20 遺伝子の発現を抑制することにより、ヒト肺がん細胞株のアポトーシスが誘発されるか否かを調べた。

まず、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト非
小細胞肺がん細胞株NCI-H1703を、RPMI-1640培地 (25mM HEPES含有) (Invitrogen
社) に牛胎仔血清 (ATCC) を10%加えた培地で懸濁し、1ウェル当たり1万個の細
25 胞密度 (培地液量0.1ml) で96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播種
した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、アンチセンスオリゴヌクレオ
チドをトランスフェクションした。

具体的には、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7および配列番号：1
0で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の3'非翻訳領域配列にハイブリダ

イズするアンチセンスオリゴヌクレオチド配列（配列番号：13）を設計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製して導入実験に用いた（以下、アンチセンスオリゴヌクレオチドと略する）。コントロールとしては、配列番号：13で示される塩基配列のリバーズ配列（配列番号：14）を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた（以下、コントロールオリゴヌクレオチドと略する）。

Opti-MEM（Invitrogen社）で希釈したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはコントロールオリゴヌクレオチドを、Opti-MEM（Invitrogen社）で5倍に希釈し室温で5分間放置したオリゴフェクトアミン（Invitrogen社）と8:3の割合（容量比）で混合し、1ウェル当たり40 μ Lの割合でプレートに添加した。オリゴヌクレオチドの終濃度は250nMとなるよう調整した。上記の条件で更に3日間培養した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS}キット（Roche Diagnostics社）を用いて添付プロトコルに従い、上記の2種類のオリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。

その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13）はコントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14）に比べて約1.6倍のアポトーシス誘導活性を示し、統計学的に有意な差（ $P \leq 0.01$ ）を示した（表3）。

〔表3〕

	アポトーシス誘導活性（ $A_{405} - A_{492}$ ）	
	平均値	標準偏差
ブランク	0.212	0.032
コントロールオリゴヌクレオチド （配列番号：14）	0.410	0.017
アンチセンスオリゴヌクレオチド （配列番号：13）	0.538	0.035

参考例3

SEMA4Bアンチセンスオリゴヌクレオチドによる遺伝子発現量の低下

アンチセンスオリゴヌクレオチド投与により、SEMA4Bおよび後述の参考例4記載のSEMA4B-M1、SEMA4B-M2ならびにSEMA4B-M3遺伝子の発現量が低下するか否か調

べた。

参考例 2 で用いたヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H1703を参考例 2 と同じ培地に懸濁し、1ウェル当たり6万個の細胞密度（培地液量0.6ml）で24穴平底組織培養プレート（BDファルコン社）に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、参考例 2 の方法に準じてアンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。但し、オリゴヌクレオチドの添加量は1ウェル当たり240 μ Lとし、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして2種類（配列番号：13および配列番号：15）、コントロールオリゴヌクレオチドとして2種類（配列番号：14および配列番号：16）のオリゴヌクレオチドを用いた。

- 10 配列番号：15および配列番号：16に由来するアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびコントロールオリゴヌクレオチドに関しては、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7および配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の3'非翻訳領域配列にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド配列（配列番号：15）を設計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製して導入実験に用いた。配列番号：15で示される塩基配列のリバーズ配列（配列番号：16）を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた。

- トランスフェクション後、5%炭酸ガス気流中、37℃で24時間培養を継続した後、RNeasy（登録商標）Mini Total RNA Kit（QIAGEN社）を用いてトータルRNAを抽出した。約300ngのトータルRNAを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems社）を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。トータルRNAにして7～9ngに相当するcDNAを鋳型とし、2種類のプライマー（配列番号：17および配列番号：18）とSYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems社）を用いてSEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3遺伝子の発現コピー数を測定した。同量の鋳型cDNA中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量をTaqMan β -actin Control Reagents（Applied Biosystems社）を用いて測定し内部標準とした。

オリゴヌクレオチド溶液の代わりに蒸留水を用いた場合（以下、非トランスフェクション群と略する）では、SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3

遺伝子発現量の総和は β -アクチン遺伝子発現量の6.6%であったのに対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13および配列番号：15）投与群では0.98%および1.1%であり、統計学的に有意（ $P \leq 0.05$ ）な遺伝子の発現量低下が認められた。

- 5 一方、コントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14および配列番号：16）投与群では4.1%および3.4%であり、非トランスフェクション群と比べて統計学的に有意な発現量低下は認められなかった。

これより、SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3遺伝子の発現抑制とアポトーシス誘導とは相関することがわかった。

10

参考例 4

SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

- ヒト肺がん細胞株（A549）由来のMarathon-Ready cDNA（CLONTECH社）を鋳型とし、2種のプライマー（配列番号：19および配列番号：20）を用いてPCR反応を行なった。該反応液50 μ lは、1 μ lの上記cDNA、2.5U PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase（STRATAGENE社）、各1.0 μ Mのプライマー（配列番号：19および配列番号：20）、200 μ M dNTPs、および25 μ l 2x GC Buffer I（Takara Bio社）を含む組成とした。PCR反応は、95°C・1分の後、95°C・1分、60°C・1分、72°C・4分を30サイクル繰り返し、さらに72°C・5分間伸長反応を行なった。PCR反応産物の3'端にdATPを付加するため、5UのEx Taq DNA Polymerase（Takara Bio社）を添加して72°C・7分間保温した。得られたPCR反応産物は、PCR Purification Kit（QIAGEN社）を用いて精製した。これをTOPO TA PCRクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR4-TOPO（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入後、アンピシリンを含むLB寒天培地中でcDNAを持つクローンを選択した。個々のクローンについて塩基配列を解析した結果、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、および配列番号：11で表されるcDNAの塩基配列がそれぞれ得られた。

SEMA4B遺伝子（GenBank Accession No. XM_044533遺伝子；NM_198925遺伝子；

NM_020210遺伝子) の塩基配列の1~237番目および2749~3766番目の塩基配列を、配列番号: 2、配列番号: 5、配列番号: 8および配列番号: 11で表される塩基配列の5'端および3'端にそれぞれ付加した塩基配列をそれぞれ配列番号: 3、配列番号: 6、配列番号: 9および配列番号: 12に示す。

- 5 配列番号: 2で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列(配列番号: 1)はSEMA4B遺伝子(GenBank Accession No. XM_044533遺伝子; NM_198925遺伝子; NM_020210遺伝子)がコードするSEMA4Bタンパク質と完全に一致した。

- 配列番号: 5で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列(配列番号: 4)を含有するタンパク質をSEMA4B-M1、配列番号: 8で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列(配列番号: 7)を含有するタンパク質をSEMA4B-M2、配列番号: 11で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列(配列番号: 10)を含有するタンパク質をSEMA4B-M3とそれぞれ命名した。
- 10

SEMA4B-M1のアミノ酸配列(配列番号: 4)は、SEMA4Bのアミノ酸配列(配列番号: 1)の208番目のSerがIleに置換されている。

- 15 SEMA4B-M1をコードするDNAの塩基配列(配列番号: 5)では、SEMA4BをコードするDNAの塩基配列(配列番号: 2)の90番目のgがaに、111番目のgがaに、623番目のgがtにそれぞれ置換されており、623番目の置換がアミノ酸置換を伴っている。

- 20 SEMA4B-M2のアミノ酸配列(配列番号: 7)は、SEMA4Bのアミノ酸配列(配列番号: 1)の163番目のMetがIleに置換されている。

SEMA4B-M2をコードするDNAの塩基配列(配列番号: 8)では、SEMA4BをコードするDNAの塩基配列(配列番号: 2)の150番目のgがaに、489番目のgがaに、528番目のcがtに、1266番目のtがcに、1588番目のcがaに、2343番目のaがgにそれぞれ置換されており、489番目の置換がアミノ酸置換を伴っている。

- 25 SEMA4B-M3のアミノ酸配列(配列番号: 10)は、SEMA4Bのアミノ酸配列(配列番号: 1)の364番目のLysがAsnに置換されている。

SEMA4B-M3をコードするDNAの塩基配列(配列番号: 11)では、SEMA4BをコードするDNAの塩基配列(配列番号: 2)の1092番目のgがtに置換されており、アミノ酸置換を伴っている。

配列番号：2 で表される塩基配列を有するDNAを有するプラスミドをSEMA4B/pCR4-TOP0、配列番号：5 で表される塩基配列を有するDNAを有するプラスミドをSEMA4B-M1/pCR4-TOP0、配列番号：8 で表される塩基配列を有するDNAを有するプラスミドをSEMA4B-M2/pCR4-TOP0、配列番号：11 で表される塩基配列を有するDNAを有するプラスミドをSEMA4B-M3/pCR4-TOP0とそれぞれ名付けた。

さらに、プラスミドSEMA4B/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B/pCR4-TOP0、プラスミドSEMA4B-M1/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B-M1/pCR4-TOP0、プラスミドSEMA4B-M2/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B-M2/pCR4-TOP0、プラスミドSEMA4B-M3/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B-M3/pCR4-TOP0とそれぞれ命名した。

参考例 5

ヒト培養細胞株における遺伝子発現量の検討

以下で使用される脳腫瘍細胞株SK-N-MC、SK-N-AS、SK-N-BE、SK-N-DZ、SK-N-FI、SK-N-SH、D341Med、Daoy、DBTRG-05MG、U-118 MG、U-87 MG、CCF-STTG1およびSW 1088；ヒト乳癌細胞株HCC1937、ZR-75-1、AU565、MCF-7およびMDA-MB-231；ヒト大腸癌細胞株Caco-2、COLO201、COLO 205、COLO 320DM、HCT-8、HT-29、LoVo、LS123、SNU-C1、SK-CO-1、SW 403、SW 48、SW480、SW 620、SW 837およびSW 948；ヒト胎児腎臓細胞株HEK293；ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H889、NCI-H1672、NCI-H1836、NCI-H2227、NCI-N417およびSHP-77；ヒト非小細胞肺癌細胞株A549、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H358、NCI-H460、NCI-H522、NCI-H661、NCI-H810、NCI-H1155、NCI-H1299、NCI-H1395、NCI-H1417、NCI-H1435、NCI-H1581、NCI-H1651、NCI-H1703、NCI-H1793、NCI-H1963、NCI-H2073、NCI-H2085、NCI-H2106、NCI-H2228、NCI-H2342およびNCI-H2347；ヒト卵巣癌細胞株ES-2、Caov-3、MDAH2774、NIH:OVCAR3、OV-90、SK-OV-3、TOV-112DおよびTOV-21G；ヒト膵臓癌細胞株PANC-1、MIA-PaCa-2、AsPC-1、BxPC-3、Capan-1およびCapan-2；ヒト前立腺癌細胞株DU145；ヒト網膜芽腫細胞株WERI-Rb-1およびY79；ヒト精巣癌細胞株Cates-1Bの86株は、ATCCより購入した。ヒト正常気道上皮細胞SAECおよびヒ

ト正常前立腺上皮細胞HPrECは、Clonetics社より購入した。ヒト大腸癌細胞株COCM1、ヒト非小細胞肺癌細胞株VMRC-LCDおよびヒト前立腺癌細胞株PC3は、JCRBより購入した。これら細胞株は参考例9以降の参考例でも用いることがある。

- 上記細胞株91株よりRNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN社)を用いてトータル
- 5 RNAを調製した。このトータルRNAを鋳型としてランダムプライマーを用いた逆転写反応でcDNAを調製し、定量的PCR反応を行うことにより、SEMA4B遺伝子(配列番号: 2)、SEMA4B-M1遺伝子(配列番号: 5)、SEMA4B-M2遺伝子(配列番号: 8)およびSEMA4B-M3遺伝子(配列番号: 11)の発現量を検討した。

- 該PCR反応は、上記トータルRNA 3~4ngより得られたcDNAを鋳型として使用し、
- 10 参考例3と同一条件でPCR反応を行い、SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3遺伝子の発現コピー数を算出した。並行してTaqMan™ Human β -actin Control Reagents (Applied Biosystems社)を用いて上記トータルRNA 1 ngに含まれる β -アクチン遺伝子のコピー数を算出し内部標準とした。

- 上記遺伝子全体の発現量を、 β -アクチン遺伝子発現量で標準化した相対的発現
- 15 率を表4に示す。

上記遺伝子発現量の総量が β -アクチン遺伝子発現量の1%を超える癌細胞株が17株見出され、上記遺伝子の癌細胞株における高発現が認められた。

〔表 4〕

細胞株	% of β -actin	細胞株	% of β -actin	細胞株	% of β -actin
SK-N-MC	0.02	COLO 201	0.66	NCI-H889	0.07
SK-N-AS	0.07	COLO 205	0.40	NCI-H1672	0.10
SK-N-BE	0.04	COLO 320DM	0.12	NCI-H1836	0.08
SK-N-DZ	0.05	HCT-8	0.36	NCI-H2227	0.15
SK-N-FI	0.20	HT-29	0.52	NCI-N417	0.04
SK-N-SH	0.11	LoVo	0.58	SHP-77	0.16
D341 Med	0.05	LS123	0.04	A549	0.35
Daoy	0.08	SNU-C1	0.52	NCI-H23	0.98
DBTRG-05MG	0.01	SK-CO-1	0.45	NCI-H226	0.04
U-118 MG	0.01	SW 403	0.31	NCI-H358	1.09
U-87 MG	0.20	SW 48	0.06	NCI-H460	0.08
CCF-STTG1	0.23	SW 480	0.03	NCI-H522	0.05
SW 1088	0.06	SW 620	0.12	NCI-H661	0.05
HCC1937	0.17	SW 837	0.59	NCI-H810	0.03
ZR-75-1	0.30	SW 948	0.18	NCI-H1155	0.07
AU565	0.06	HEK293	0.05	NCI-H1299	0.10
MCF-7	0.06	SAEC	1.73	NCI-H1395	0.39
MDA-MB-231	0.06	NCI-H187	0.38	NCI-H1417	0.21
Caco-2	0.04	NCI-H378	0.17	NCI-H1435	0.26
COCM1	0.10	NCI-H526	0.14	NCI-H1581	0.16
NCI-H1651	1.03	ES-2	0.02	BxPC-3	0.17
NCI-H1703	0.21	Caov-3	0.13	Capan-1	0.07
NCI-H1793	0.29	MDAH2774	0.37	Capan-2	0.27
NCI-H1963	0.12	NIH:OVCA3	0.14	HPrEC	2.87
NCI-H2073	0.15	OV-90	0.23	DU 145	3.05
NCI-H2085	0.02	SK-OV-3	2.44	PC3	0.43
NCI-H2106	0.07	TOV-112D	0.06	WERI-Rb-1	0.90
NCI-H2228	1.89	TOV-21G	1.00	Y79	0.06
NCI-H2342	0.18	PANC-1	1.88	Cates-1B	0.01
NCI-H2347	0.24	MIA-PaCa-2	0.02		
VMRC-LCD	0.09	AsPC-1	0.24		

参考例 6

組換え型完全長タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

- 5 参考例 4 で得たプラスミドSEMA4B/pCR4-TOPOを鋳型とし、PCRでSEMA4B遺伝子を

増幅した。該反応における反応液の組成はSEMA4B/pCR4-TOPO 2ngを鋳型として使用し、Pfu Turbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE社) を2.5U、2種類のプライマー (配列番号: 19 および配列番号: 21) を各1 μ M、dNTPsを200 μ M、および10x Pfu Bufferを5 μ l加え、50 μ lの液量とした。PCR反応は、95°C・1分の後、95°C・1分、60°C・1分、72°C・4分のサイクルを25回繰り返し行った。次にPCR Purification Kit (QIAGEN社) にて該PCR反応産物を精製した後、制限酵素Xba I およびEco RIにて処理した。プラスミドp3xFLAG-CMV-14 (Sigma社) もXba I およびEco RIにて処理した。それぞれのDNA断片はPCR Purification Kitにて精製し、DNA Ligation Kit ver.2 (Takara Bio社) を用いてライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液を大腸菌TOP10に導入した後、形質転換された大腸菌をアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択し個々のクローンを解析した結果、SEMA4B 遺伝子 (配列番号: 2) に相当するcDNA断片を含むプラスミドpCMV-14-SEMA4B を得た。

15 参考例 7

組換え型タグ付き完全長タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

SEMA4Bタンパク質のC末端に3xFLAGタグを融合したタンパク質を発現する動物細胞用発現ベクターを構築した。SEMA4B遺伝子をPCRで増幅する時に用いるプライマーペアを、別のプライマーペア (配列番号: 19 および配列番号: 20) に変更したこと以外は参考例 6 記載の方法に従い、形質転換した大腸菌の選別を行った。その結果、SEMA4Bタンパク質 (配列番号: 1) のC末端に3xFLAGタグが融合したタンパク質をコードするcDNA断片を含むプラスミドpCMV-14-SEMA4B-3xFLAG を得た。

25 参考例 8

ペプチド抗体の作製と精製

SEMA4Bタンパク質 (配列番号: 1) 、SEMA4B-M1タンパク質 (配列番号: 4) 、SEMA4B-M2タンパク質 (配列番号: 7) およびSEMA4B-M3タンパク質 (配列番号: 10) のアミノ酸配列に基づき、12~15アミノ酸からなる以下の4種のペプチド (

ペプチド1～4)をFmoc固相合成法により合成した。

ペプチド1のアミノ酸配列〔

Asn-Ser-Ala-Arg-Glu-Arg-Lys-Ile-Asn-Ser-Ser-Cys(配列番号:22)〕は、SEMA4Bタンパク質(配列番号:1)の402番目から412番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

ペプチド2のアミノ酸配列〔

Ser-Val-Val-Ser-Pro-Ser-Phe-Val-Pro-Thr-Gly-Glu-Lys-Pro-Cys(配列番号:23)〕のアミノ酸配列は、SEMA4Bタンパク質(配列番号:1)の582番目から596番目までの配列である。

10 ペプチド3のアミノ酸配列〔

Pro-Leu-Asp-His-Arg-Gly-Tyr-Gln-Ser-Leu-Ser-Asp-Ser-Pro-Cys(配列番号:24)〕は、SEMA4Bタンパク質(配列番号:1)の781番目から794番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

ペプチド4のアミノ酸配列〔

15 Ser-Arg-Val-Phe-Thr-Glu-Ser-Glu-Lys-Arg-Pro-Leu-Ser-Cys(配列番号:25)〕は、SEMA4Bタンパク質(配列番号:1)の797番目から809番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

上記ペプチド1、ペプチド2、ペプチド3およびペプチド4のそれぞれのペプチドに、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)をキャリアータンパク質として結合させ抗原とし、以下のように、ウサギポリクローナル抗体を作製した。

20 免疫動物は雄性ウサギKBL:JW(11週齢、オリエンタル酵母)一羽を用い、初回感作は完全フロインドアジュバンド(Difco社)懸濁液、2回目以降は不完全フロインドアジュバンド(Difco社)懸濁液を用いた。感作は背部皮下注射により行い、1回の感作には各抗原0.5mgを用い、初回感作後14日毎に3回繰り返した。初回感作後52日目に麻酔下頸動脈採血を行い、血清約50mlを得た。このようにして得られた血清を硫酸アンモニウム塩析法により濃縮し、得られた粗IgG画分全量をプロテインAアフィニティーカラム(Amersham-Bioscience社)により精製し、ペプチド1、ペプチド2、ペプチド3またはペプチド4を免疫したウサギから、それぞれ約103mg、約76mg、約112mgおよび約122mgの精製IgGを得た。さらに、各々の

免疫源ペプチドを固定化したカラムに結合するIgG画分を取得した。固定化には各ペプチドのC末端のCysを利用し、ホウ酸緩衝液を用いてセファロースカラム（Amersham-Bioscience社）にカップリングした。カラムからの溶出には8M尿素／リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を用いた。溶出液をPBSに対して透析して尿素を除いた後、限外濃縮、フィルターろ過滅菌することにより、ペプチド1、ペプチド2、ペプチド3およびペプチド4に対するアフィニティー精製抗体AS-2531、AS-2532、AS-2591およびAS-2592を、約15mg、約126mg、約17mgおよび約35mgずつ取得した。

10 参考例 9

ウサギペプチド抗体を用いたウェスタンブロッティング

- SEMA4Bタンパク質（配列番号：1）の検出は、参考例8で作製した精製ペプチド抗体を用いて行った。ヒト非小細胞肺癌由来NCI-H358細胞 1.5×10^6 個を10%牛胎仔血清（JRH社）を含むRPMI-1640培地（Invitrogen社）10 mlに懸濁し、直径10cmのペトリディッシュに播種した。5%炭酸ガス気流下、37℃で一晩培養した。参考例6で作製したプラスミドpCMV-14-SEMA4B 6 μ g とPlus試薬（Invitrogen社）およびOPTI-MEM I（Invitrogen社）とを混合し、室温で15分間放置した後、LipofectAMINEトランスフェクション試薬（Invitrogen社）およびOPTI-MEM Iを添加し、さらに室温で15分間放置した。この混合液を培養液に滴下して培養を継続した。発現プラスミド導入2日後に細胞を氷冷したPBSで洗浄し、氷冷したRIPA緩衝液〔50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、1%Triton X-100、0.1%SDS、1%デオキシコール酸、Complete™タブレット（Roche Diagnostics社）、Phosphatase Inhibitor Cocktail-2（Sigma社）〕1mlを添加し4℃で30分間放置した。このRIPA緩衝液を回収し、15,000rpmで20分間遠心分離した上澄液を無細胞抽出液とした。この無細胞抽出液および2倍濃度SDS-PAGE用サンプルバッファー〔125mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、40%グリセロール、4%SDS、0.04%ブROMOFENOLブルーおよび5% 2-メルカプトエタノール〕を等容量で混合し、95℃で5分間加熱した後、10 μ lを10%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。泳動分離したタンパク質は、常法に従いクリアブロットP膜（ATTO社）に転写した

後、ブロッキング溶液〔50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、500 mM 塩化ナトリウム、0.1% Tween 20、5% スキムミルク〕中に1時間室温放置した。次に、参考例8で作製したペプチド抗体AS-2531、AS-2532、AS-2591またはAS-2592を、3 μ g/mlの濃度となるようブロッキング溶液で希釈し、4°Cにて一晩反応させた。続いて、

5 ブロッキング溶液で5万倍または10万倍に希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体（Amersham-Bioscience社）中で1時間室温放置した。検出にはECL plus（Amersham-Bioscience社）を用い、添付プロトコールに従いSEMA4Bタンパク質を検出した。

AS-2531を除き、AS-2532、AS-2591およびAS-2592のいずれを用いた場合でも、

10 分子量100kD近傍の位置にSEMA4Bタンパク質に由来する特異的なバンドが認められた。

参考例 10

ウサギペプチド抗体を用いた免疫沈降

15 参考例8で作製した精製ペプチド抗体を用いて、SEMA4Bタンパク質の免疫沈降を非変性状態にて行った。

参考例7で得たプラスミドpCMV-14-SEMA4B-3xFLAGを用いて、参考例9と同様の操作で無細胞抽出液を調製した。Protein G-Sepharose 4FF（Amersham-Bioscience社）を等容量のRIPA緩衝液で懸濁した懸濁液50 μ lに無細胞抽出液400 μ lを加え、

20 さらに参考例8記載のペプチド抗体AS-2531、AS-2532、AS-2591またはAS-2592のいずれか一つを5 μ g加えた混合液を調製し、4°Cにて一晩撹拌した。Protein G-Sepharose 4FF共沈殿画分をRIPA緩衝液にて洗浄後、50 μ lのSDS-PAGE用サンプルバッファー〔62.5mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、20%グリセロール、2%SDS、0.02%ブロモフェノールブルーおよび2.5%2-メルカプトエタノール〕に懸濁し、

25 95°Cで5分間加熱した後、5 μ lまたは10 μ lを10%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。検出は参考例9記載の方法に準拠した。但し、マウス抗FLAG M2抗体（Sigma社）をブロッキング溶液で0.2 μ g/mlまたは0.1 μ g/mlとなるように希釈したものを一次抗体として、HRP標識抗マウスIgG抗体（Amersham-Bioscience社）をブロッキング溶液で2.5万倍または5万倍に希釈したものを二次抗体として

用いた。

ペプチド抗体AS-2531、AS-2532、AS-2591およびAS-2592のいずれを用いて免疫沈降を行った場合にも、分子量100kD近傍にSEMA4Bタンパク質に由来する特異的なバンドが認められた。

- 5 これより、ペプチド抗体AS-2531、AS-2532、AS-2591およびAS-2592は、未変性のSEMA4Bタンパク質と結合することが明らかとなった。

参考例 1 1

癌細胞株におけるSEMA4Bタンパク質の発現検討

- 10 肺癌細胞株NCI-H2228、NCI-H1651、NCI-H358、NCI-H23ならびにNCI-H1703；卵巣癌細胞株SKOV-3ならびにTOV-21G；前立腺癌細胞株DU145；および膵癌細胞株PANC-1を、直径10cmのペトリディッシュ2枚で培養した。各々の細胞についてペトリディッシュ1枚分をトリプシン・EDTA（Invitrogen社）で分散し、細胞数を計測した。計測した細胞数を基にして、 5×10^6 個の細胞に対して1 mlの割合で氷冷RIPA
- 15 緩衝液（参考例 9 に記載）を残りのペトリディッシュ1枚に添加し、4℃で30分間放置した。このRIPA緩衝液を回収し、15,000rpmで20分間遠心分離した上澄液を無細胞抽出液とした。一方、Size™ X ProteinG Immunoprecipitation Kit（Pierce社）の添付プロトコールに従い参考例 8 記載のペプチド抗体AS-2531をProteinG-Sepharose 4FF（Amersham-Bioscience社）に架橋した樹脂を用意し、等
- 20 容量のRIPA緩衝液で懸濁した。この懸濁液30 μ lに前述の無細胞抽出液400 μ lを加え、4℃にて一晩撹拌を行った。ProteinG-Sepharose 4FF共沈殿画分をRIPA緩衝液にて洗浄後、参考例 1 0 記載のSDS-PAGE用サンプルバッファー30 μ lに懸濁し95℃で5分間加熱した後、20 μ lを10%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。検出はペプチド抗体AS-2532を用いて参考例 9 記載の方法に準じて行った。
- 25 上記9種類の細胞株の中で、NCI-H2228、NCI-H358、NCI-H23、SKOV-3、DU145およびPANC-1の各細胞株において、分子量100kD近傍に、SEMA4Bタンパク質に由来する特異的なバンドが認められた。これより、SEMA4Bタンパク質が、上記6種類の癌細胞株で高発現していることが明らかとなった。

参考例 1 2

組換え型完全長タンパク質安定発現細胞株の樹立

- ヒト非小細胞肺癌由来NCI-H358細胞 2.0×10^5 個を10%牛胎仔血清（JRH社）、1mMピルビン酸ナトリウムおよび25mM HEPESを含むRPMI-1640培地（Invitrogen社）2 mlに懸濁し、6ウェルプレートに播種した後、5%炭酸ガス気流下、37℃で一晩培養した。一方、OPTI-MEM I（Invitrogen社）で希釈した参考例 6 記載のプラスミドpCMV-14-SEMA4B 1 μ gをPlus試薬（Invitrogen社）6 μ lと混合し室温で15分間放置した後、OPTI-MEM I で希釈したLipofectAMINEトランスフェクション試薬（Invitrogen社）4 μ lを添加し、さらに室温で15分間放置した。この混合液を培養液に滴下してさらに1日培養を継続した後、トリプシン・EDTA（Invitrogen社）で細胞を分散し、上記の培養培地にG418（プロメガ社）を400 μ g/mlとなるように加えた培地で10倍に希釈して24ウェルプレートに播種した。3日または4日ごとにG418を含む上記培地（G418選択培地）を交換しながら5%炭酸ガス気流下、37℃で培養を継続した。1個～3個の細胞が増殖しコロニーを形成したウェルから細胞を回収し、48ウェルプレートの2ウェルに等しく播種した。細胞密度が50%以上になるまで培養を継続した後、1ウェル分の細胞に参考例 1 0 記載のSDS-PAGE用サンプルバッファー 50 μ lを加え、細胞溶解液を調製した。95℃で5分間加熱処理した後、5 μ lを10%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。参考例 9 で記載した方法に準じ、ペプチド抗体AS-2532を用いてウェスタンブロッティングを行い、SEMA4Bタンパク質（配列番号：1）を構成的に発現する安定発現細胞を探索した。もう一方のウェルから回収した細胞を、1 ウェルあたり0.7個となるように希釈後、96ウェルプレートに播種した。G418選択培地を3日あるいは4日ごとに交換しながら細胞密度が50%程度になるまで、5%炭酸ガス気流下、37℃で培養を継続した。再び、48ウェルプレートの2ウェルに等しく播種し、細胞密度が50%以上になるまで培養を継続し、1 ウェル分の細胞から調製した細胞溶解液を用いて、上記と同様にウェスタンブロッティングを行った。SEMA4Bタンパク質（配列番号：1）を最も高発現するクローンを選び、SEMA4B安定発現細胞株SEMA4B/H358を得た。

参考例 1 3

SEMA4Bタンパク質の局在性検討（ビオチン標識）

- ヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H2228ならびにNCI-H358、および参考例 1 2 で作製した組換え型完全長タンパク質の安定発現細胞株（SEMA4B/H358）を用いて、細胞
- 5 表層上に露出しているタンパク質をCellular Labeling and Immunoprecipitation Kit（Roche Diagnostics社）を用いてビオチン標識した。続いて、参考例 9 の方法に従い調製した無細胞抽出液1mlと参考例 8 で作製したペプチド抗体AS-2591 $5 \mu\text{g}$ とを用いて、参考例 1 0 の方法に従って免疫沈降しSDS-PAGEを行った。HRP
- 10 標識したストレプトアビジン（Amersham-Bioscience社）を用いて検出したところ、分子量100 k D 近傍にSEMA4Bタンパク質に由来するバンドが認められ、SEMA4Bタンパク質、SEMA4B-M1タンパク質、SEMA4B-M2タンパク質およびSEMA4B-M3タンパク質が細胞表面上に局在していることが明らかとなった。

参考例 1 4

15 SEMA4Bタンパク質の局在性検討（FACS解析）

- ヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H2228ならびにNCI-H358、および参考例 1 2 に記載したSEMA4B/H358を、直径10cmのペトリディッシュにそれぞれ播種し、サブコンフルエントになるまで培養した。各細胞をPBSで洗浄後、0.5%BSAおよび5mM EDTAを含むPBSを加え室温で15分間放置し、細胞を分散した。次に、緩衝液A〔2%牛胎
- 20 仔血清（JRH社）および0.1%アジ化ナトリウムを含むHBSS（Hanks' Balanced Salt Solutions、Invitrogen社）〕で 4×10^6 個/mlの濃度になるように細胞を懸濁し、終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ となるようAS-2532または非免疫ウサギIgG（Jackson社）を加え、氷中に3時間放置した。緩衝液Aで細胞を洗浄後、 $10 \mu\text{g/ml}$ のAlexa488標識抗ウサギIgG抗体（Molecular Probes社）を含む緩衝液Aで懸濁し、氷上にて2時間放置し
- 25 た。緩衝液Aで再び洗浄後、FACScan（BDバイオサイエンス社）にて解析した。その結果、いずれの細胞においてもウサギペプチド抗体AS-2532特異的に染色され、SEMA4Bタンパク質、SEMA4B-M1タンパク質、SEMA4B-M2タンパク質およびSEMA4B-M3タンパク質が細胞表面上に局在していることが明らかとなった。

参考例 1 5

アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H358のアポトーシス誘導

- 5 参考例 2 に記載のNCI-H1703以外のヒト非小細胞肺癌細胞株においてもアンチセンスオリゴヌクレオチド導入によりアポトーシスが誘発されるか否かを検討した。

- 10 10%牛胎仔血清 (JRH社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび25mM HEPESを含むRPMI-1640培地 (Invitrogen社) でNCI-H358を懸濁し、1 ウェル当たり 8×10^3 個の細胞密度 (培地液量 $80 \mu\text{l}$) となるよう、NCI-H358を96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播種し、5%炭酸ガス気流中、 37°C で一晩培養した。一方、参考例 2 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3) およびコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4) 各 $0.06 \mu\text{g}$ をOPTI-MEM I (Invitrogen社) で希釈し、Plus試薬 (Invitrogen社) $0.5 \mu\text{l}$ と混合した後、室温で15分間放置した。OPTI-MEM I で希釈したLipofectAMINEトランスフェクション試薬 (15 Invitrogen社) $0.4 \mu\text{l}$ を加え、さらに室温で15分間放置した。この混合液全量をNCI-H358の培養液に添加し3日間培養を継続した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics社) およびCaspase-Glo 3/7 assay (Promega社) の添付プロトコールに従い、上記オリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。

- 20 その結果、NCI-H358においては、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} およびCaspase-Glo 3/7 assayともに、アンチセンスオリゴヌクレオチドは陰性対象として用いたコントロールオリゴヌクレオチドに比べ、それぞれ1.42倍および1.77倍のアポトーシス誘導活性を示し、統計学的に有意な差 ($P \leq 0.01$) を示した (表 5 および表 6)。

25

〔表 5〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0. 2 1 7	0. 0 0 7
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	0. 3 3 0	0. 0 4 1
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	0. 4 6 7	0. 0 2 9

〔表 6〕

	アポトーシス誘導活性 (CPS)	
	平均値	標準偏差
ブランク	7 6 2 5	2 3 5
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	8 7 2 7	1 8 8
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	1 5 4 5 2	5 7 0

5 参考例 1 6

アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H2228、NCI-H1651およびNCI-H23のアポトーシス誘導

NCI-H1703 (参考例 2) およびNCI-H358 (参考例 1 5) 以外のヒト非小細胞肺癌細胞株においても、アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によりアポトーシスが誘発されるか否かを検討した。

10

NCI-H2228には、10%牛胎仔血清 (JRH社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび25mM HEPESを含むRPMI-1640培地 (Invitrogen社) を用いた。NCI-H1651には、10%FBSを含むACL-4培地 (ATCC) を用いた。NCI-H23には、10%牛胎仔血清 (JRH社) および25mM HEPESを含むRPMI-1640培地 (Invitrogen社) を用いた。各細胞をそれぞれの培地に懸濁し、1 ウェル当たり 7.5×10^3 個 (NCI-H2228)、 7.5×10^3 個 (NCI-H1651) および 5×10^3 個 (NCI-H23) の細胞密度 (培地液量 $125 \mu\text{l}$) となるよう96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播種し、5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した。一方、参考例 2 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3) およびコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4) 各0.135

μg をOPTI-MEM I (Invitrogen社) で希釈し、Plus試薬 (Invitrogen社) $0.75\mu\text{l}$ と混合した後、室温で15分間放置した。OPTI-MEM I で希釈したLipofectAMINEトランスフェクション試薬 (Invitrogen社) $0.4\mu\text{l}$ を加え、さらに室温で15分間放置した。この混合液全量を各細胞の培養液に添加し3日間培養を継続した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics社) の添付プロトコールに従い上記オリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。

その結果、いずれの細胞株においても、アンチセンスオリゴヌクレオチドは陰性対象として用いたコントロールオリゴヌクレオチドに比べ、それぞれ1.58倍 (NCI-H2228)、1.21倍 (NCI-H1651) および1.25倍 (NCI-H23) のアポトーシス誘導活性を示し、危険率は $P \leq 0.05$ (NCI-H2228)、 $P \leq 0.05$ (NCI-H1651) および $P \leq 0.01$ (NCI-H23) と算出され、統計学的に有意な差を示した (表7、表8および表9)。

〔表7〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0.312	0.009
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 14)	0.526	0.043
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 13)	0.829	0.123

15 〔表8〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0.523	0.091
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 14)	1.152	0.101
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 13)	1.390	0.104

〔表 9〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0. 6 7 8	0. 0 2 8
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	1. 0 8 1	0. 0 5 0
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	1. 3 5 1	0. 0 5 8

参考例 1 7

ウサギペプチド抗体を用いたアポトーシス誘発

- 5 ヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H2228を、参考例 8 で取得したウサギペプチド抗体 AS-2531およびAS-2532で処理し、これらウサギペプチド抗体のアポトーシス誘導活性を測定した。

- NCI-H2228を、10%牛胎仔血清 (JRH社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび25mM HEPESを含むRPMI-1640培地 (Invitrogen社) に懸濁し、1 ウェル当たり 4×10^3 個の細胞密度になるようI型コラーゲンをコートした96穴平底組織培養プレート (BD
10 ファルコン社) に播種し、5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した。参考例 8 で取得したウサギペプチド抗体AS-2531、AS-2532、および非免疫ウサギIgG (Jackson社) をPBSで希釈し、各抗体について終濃度が $15 \mu\text{g/ml}$ 、 $45 \mu\text{g/ml}$ および $150 \mu\text{g/ml}$ となるよう培養液にそれぞれ添加した。さらに5日間培養を継続した後、Cell
15 Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics社) の添付プロトコールに従い、上記ウサギペプチド抗体のアポトーシス誘導活性を測定した。

- その結果、 $45 \mu\text{g/ml}$ および $15 \mu\text{g/ml}$ のAS-2531存在下では、同濃度の非免疫ウサギIgGに比べ、1.26倍および1.31倍のアポトーシス誘導活性を示した ($P \leq 0.05$ および $P \leq 0.01$)。また、 $150 \mu\text{g/ml}$ のAS-2532存在下では、同濃度の非免疫ウサギIgG
20 に比べ、1.27倍のアポトーシス誘導活性を示した ($P \leq 0.01$)。

このように、SEMA4Bタンパク質、SEMA4B-M1タンパク質、SEMA4B-M2タンパク質およびSEMA4B-M3タンパク質は、ヒト肺癌細胞の生存維持に重要な働きをしていることが明らかとなった。

実施例 1

PlexinB1とSEMA4Bとの結合

(1) PlexinB1細胞外領域cDNAのクローニング

- ヒト腎臓由来cDNA (MTC Panel、BD CLONTECH社) を鋳型とし、PlexinB1のcDNA
5 をPCRで取得した。該反応における反応液の組成は上記cDNA 1 μ lを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) を1.25 U、2種類のプライマー (配列番号: 27 および配列番号: 28) を各2 μ M、dNTPsを200 μ M、および2x GC Buffer I (Takara Bio社) を10 μ l加え、20 μ lの液量とした。PCR反応は、95°C・1分の後、95°C・15秒、60°C・30秒、72°C・6分30秒のサイクルを40回繰り返し、
10 さらに72°C・7分間の反応を追加した。同様の条件で、別のプライマーペア (配列番号: 29 および配列番号: 30) を用いたPCR反応も並行して行った。それぞれのPCR反応産物をTOPO XL PCRクローニングキット (Invitrogen社) の処方に従い、クリスタルバイオレットを1.6 μ g/mlとなるよう添加した0.8%アガロースゲルで分離し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN社) を用いて精製した。これを
15 プラスミドベクターpCR-XL-TOPO (Invitrogen社) へサブクローニングし大腸菌TOP10 (Invitrogen社) に導入した後、カナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、PlexinB1全長cDNAの-95番目から3016番目に相当するcDNA断片を含むプラスミド (pCR-XL-PLXNB1-NT)、および1628番目から5840番目に相当するcDNA断片を含むプラスミド (pCR-XL-PLXNB1-CT) をそ
20 れぞれ得た。

- まず、pCR-XL-PLXNB1-NTを2種類の制限酵素 (EcoRIとSnaBI) で同時消化し約2kbpのDNA断片を得た (DNA断片-1)。続いて、pCR-XL-PLXNB1-CTを3種類の制限酵素 (SnaBI、DraIおよびXbaI) で同時消化し約4.1kbpのDNA断片を得た (DNA断片-2)。最後にpcDNA3.1(+)プラスミド (Invitrogen社) を2種類の制限酵素 (EcoRIとXbaI
25) で同時消化し、約5.4kbpのDNA断片を得た (DNA断片-3)。上記DNA断片-1、DNA断片-2およびDNA断片-3を、MinElute Gel Extraction Kitを用いて別々に精製した後、容量比2:2:1の割合で混合し5 μ lとした。さらにDNA Ligation Kit ver. 2 (Takara Bio社) の溶液Iを5 μ l加え16°Cで30分間反応させた後、2 μ lを抜きとり、大腸菌TOP10を形質転換した。個々のクローンの配列を解析し、PlexinB1全長cDNA

の-95番目から5840番目に相当するcDNA断片を含むプラスミド（pcDNA3.1(+)-PLXNB1-NT2）を得た。

次に、細胞外領域のみをコードするcDNA断片を取得する為に、上記プラスミド（pcDNA3.1(+)-PLXNB1-NT2）を鋳型とするPCR反応を行った。該反応における反応組成は、上記プラスミドを10ng、Pfu Turbo DNA Polymeraseを1.25 U、2種類のプライマー（配列番号：31および配列番号：32）を各1 μ M、dNTPsを200 μ M、および2x GC Buffer Iを10 μ l加え、20 μ lの液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、65 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・5分のサイクルを30回繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ C・7分間の反応を追加した。PCR反応産物をTOPO XL PCRクローニングキットの処方に従い、クリスタルバイオレットを1.6 μ g/mlとなるよう添加した0.8%アガロースゲルで分離し、4~5kbpの長さのDNAをMinElute Gel Extraction Kitを用いて精製した。これをプラスミドベクターpCR-XL-TOPOへサブクローニングし、大腸菌TOP10に導入した後、カナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンを解析した結果、PlexinB1全長cDNAの-44番目から4443番目に相当する断片の両端に、制限酵素BamHIの認識配列が付加したDNA断片を含むプラスミドpCR-XL-PLXNB1-ECDを得た。

（2）PlexinB1細胞外領域部分タンパク質発現ベクターの構築

上記（1）で得られたプラスミド（pCR-XL-PLXNB1-ECD）のPlexinB1配列中に存在するBamHI認識配列を潰すために、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（STRATAGENE社）の処方に従い、PlexinB1全長cDNAの3483番目に位置するTをCに変換し、サイレント変異を導入したプラスミドpCR-XL-PLXNB1-ECD-M1を作製した。

一方、C末端にヒト免疫グロブリンの定常（Fc）領域を付加した融合タンパク質としてPlexinB1細胞外領域を発現させるために、ヒトFc領域をPCRで増幅した。反応液の組成は、ヒト脾臓由来cDNA（MTC Panel、BD CLONTECH社）を1 μ l、Pfu Turbo DNA Polymeraseを1.25 U、2種類のプライマー（配列番号：33および配列番号：34）を各0.5 μ M、dNTPsを200 μ M、および2x GC Buffer Iを10 μ l加え、20 μ lの液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、65 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・1分のサイクルを30回繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ C・7分間の反応を追加した。PCR反応産

物をMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN社) を用いて精製し、プラスミドベクターpCR4-TOPO (Invitrogen社) へサブクローニングした。形質転換した大腸菌TOP10をカナマイシンを含むLB寒天培地中で選択し個々のクローンの配列を解析した結果、ヒトFc領域をコードするcDNA断片を含むプラスミドpCR4-TOPO-Fcを得た。

まず、pCR4-TOPO-Fcを2種類の制限酵素 (BamHIおよびHindIII) で同時消化し、約0.7kbpのDNA断片を得た (DNA断片-4)。次に、前述のpCR-XL-PLXNB1-ECD-M1をBamHIで消化し、約4.5kbpのDNA断片を得た (DNA断片-5)。最後にpcDNA3.1(-)プラスミド (Invitrogen社) を2種類の制限酵素 (BamHIおよびHindIII) で同時消化し、約5.4kbpのDNA断片を得た (DNA断片-6)。DNA断片-4、DNA断片-5およびDNA断片-6をMinElute Gel Extraction Kitを用いて別々に精製した後、容量比2:2:1の割合で混合し5 μ lとした。DNA Ligation Kit ver.2の溶液Iを5 μ l加え、16 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた後、2 μ lを抜きとり大腸菌TOP10を形質転換した。アンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した個々のクローンを解析した結果、ヒトFc領域がC末端側に繋がったPlexinB1キメラタンパク質を発現させることのできるプラスミドpcDNA3.1(-)-PLXNB1-ECD/Fcを得た。

(3) 組換え型PlexinB1/Fc融合タンパク質の調製

参考例5に記載したヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293 (1.5 \times 10⁶個) を10%牛胎仔血清 (JRH社) を含むDMEM培地 (Invitrogen社) 10mlに懸濁し、I型コラーゲンをコートした直径10cmのペトリディッシュ (BDファルコン社) に播種後、5%炭酸ガス気流下、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。実施例1-(2) で得たプラスミドpcDNA3.1(-)-PLXNB1-ECD/Fc 6 μ gをOPTI-MEM I (Invitrogen社) で200 μ lとなるように希釈し、FuGENE6トランスフェクション試薬 (Roche Diagnostics社) 18 μ lを加え室温で30分間放置した。この混合液を培養液に滴下し一晩培養を継続した。翌日細胞をPBSで洗浄し、OPTI-MEM I (Invitrogen社) 10mlに培地交換し、さらに二日間培養を継続した。その後、培養液をMILLEX-GV (MILLIPORE社) でろ過し、分画分子量が10,000の膜を装着した遠心式限外濃縮装置 (MILLIPORE社) を用いて約20倍に濃縮した。この濃縮液をPLXNB1/Fcと命名した。プラスミドpcDNA3.1(-)-PLXNB1-ECD/Fcを添加せずにトランスフェクションした場合の培養

上清も並行して調製し、陰性対照と命名した。

(4) PlexinB1とSEMA4Bとの結合実験

- 参考例 10 に記載の方法に従って、ヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H358にプラスミドpCMV-14-SEMA4B-3xFLAG (参考例 7 に記載) をトランスフェクションし、無細胞抽出液を調製した。実施例 1 - (3) で調製したPLXNB1/Fc 200 μ lまたは陰性対照200 μ lに、上記無細胞抽出液を250 μ l加えた混合液を用意し、参考例 10 に記載したProtein G-Sepharose 4FF (Amersham-Bioscience社) 懸濁液50 μ lを添加し、4°Cで一晩攪拌した。Protein G-Sepharose 4FF共沈殿画分をRIPA緩衝液 (参考例 9 に記載) で洗浄後、50 μ lのSDS-PAGE用サンプルバッファー (参考例 9 に記載) に懸濁した。95°Cで5分間加熱した後、20 μ lを7.5%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。AS-2591抗体 (参考例 8 に記載) を、参考例 9 記載のブロッキング溶液で3 μ g/mlとなるように希釈したもの、またはマウス抗FLAG M2抗体 (Sigma社) を上記ブロッキング溶液で0.2 μ g/mlとなるように希釈したものを一次抗体として用いた。その後、HRP標識抗ウサギIgG抗体 (Amersham-Bioscience社) を上記ブロッキング溶液で10万倍に希釈したもの、またはHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham-Bioscience社) を上記ブロッキング溶液で5万倍に希釈したものを二次抗体として用い、ECL plus (Amersham-Bioscience社) の添付プロトコールに従いSEMA4Bタンパク質を検出した。その結果、PLXNB1/Fcを用いた場合にのみ、SEMA4Bタンパク質が検出できた。
- 20 これより、SEMA4Bタンパク質はPlexinB1タンパク質と結合することが明らかとなった。

実施例 2

PlexinB1とSEMA4Bとの結合 (FACS解析)

- 25 (1) 組換え型PlexinB1/Fc融合タンパク質安定発現株の樹立

参考例 5 に記載したヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293 (2×10^6 個) を10%牛胎仔血清 (JRH社) を含むDMEM培地 (Invitrogen社) 10mlに懸濁し、I型コラーゲンをコートした直径10cmのペトリディッシュ (岩城硝子社) に播種後、5%炭酸ガス気流下、37°Cで一晩培養した。実施例 1 - (2) で得たプラスミド

pcDNA3.1(-)-PLXNB1-ECD/Fc 6 μ gをOPTI-MEM I (Invitrogen社) で1200 μ lとなるように希釈し、FuGENE6トランスフェクション試薬 (Roche Diagnostics社) 18 μ lを加え室温で30分間放置した。培養液に滴下してさらに1日培養を継続した後、トリプシン・EDTA (Invitrogen社) で細胞を分散し、上記の培養培地にG418 (プロメガ社) を750 μ g/mlとなるように加えた培地 (G418選択培地) で10倍に希釈して、I型コラーゲンをコートした直径10cmのペトリディッシュに播種した。3日または4日ごとにトリプシン・EDTA で細胞を分散し10倍に希釈した後、G418選択培地で培養を継続した。G418選択培地で培養を開始してから2週間後に増殖してきた細胞を集め、PlexinB1/Fc 融合タンパク質安定発現 HEK293 細胞株 (PLXNB1-Fc/HEK293) と命名した。

(2) PlexinB1/SEMA4B結合活性の解析

実施例2-(1)で得たPLXNB1-Fc/HEK293を10%牛胎仔血清 (JRH社) を含むDMEM培地 (Invitrogen社) 10mlに懸濁し、I型コラーゲンをコートした直径10cmのペトリディッシュ (岩城硝子社) に播種後、5%炭酸ガス気流下、37°Cで一晩培養した。翌日細胞をPBSで洗浄し、非必須アミノ酸 (Invitrogen社) とITS-Xサプリメント (Invitrogen社) を含むM199培地 (Invitrogen社) 10mlに培地交換し、さらに二日間培養を継続した。その後、培養液を孔径0.45 μ mのフィルター (BDファルコン社) でろ過し、分画分子量100,000の限外濃縮装置 (MILLIPORE社) を用いて約10倍に濃縮した。この濃縮液をPLXNB1/Fc (lot No. 2) と命名し以下の検討に用いた。

参考例5に記載したヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H358および参考例12で得たSEMA4B安定発現細胞株SEMA4B/H358を、10%牛胎仔血清 (JRH社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび25mM HEPESを含むRPMI-1640培地 (Invitrogen社) で懸濁し、それぞれの細胞を直径10cmのペトリディッシュ (BDファルコン社) に播種し、サブコンフルエントになるまで培養した。各細胞をPBSで洗浄し、0.25%BSAおよび2.5mM EDTAを含むPBSを加え15分間室温放置して細胞を分散した。前述のPLXNB1/Fc (lot No. 2) を50 μ l含むように調製した250 μ lの緩衝液A (参考例14に記載) で 3×10^6 個の細胞を懸濁し、氷中に3時間放置した。その後、緩衝液Aで細胞を洗浄し、10 μ g/mlのAlexa488標識抗ヒトIgG抗体 (Molecular Probes社) を含む緩衝液Aで再懸濁し、氷中で1時間放置した。緩衝液Aで再度洗浄後、FACScan (

BDバイオサイエンス社) で細胞に結合したAlexa488の蛍光強度を測定した。

その結果、いずれの細胞もPLXNB1/Fc (lot No. 2) と結合したものの、SEMA4B/H358細胞株はNCI-H358細胞株に比べPLXNB1/Fc (lot No. 2) 結合量が多く、SEMA4Bタンパク質発現量と良く相関した。このことから、SEMA4Bタンパク質とPlexinB1タンパク質が特異的に結合することが明らかとなった。

実施例 3

ウサギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体のSEMA4B/PlexinB1結合阻害活性

(1) 組換え型SEMA4Bタンパク質の発現と精製

- 10 組換え型SEMA4Bタンパク質は、SEMA4Bの細胞外ドメインとそのC末端側にFLAG-tagまたは6 x His-tagを付加したタンパク質を発現するようにベクターを作製し、BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System (Invitrogen社) を用いてタンパク質発現系の構築を行った。すなわち、FLAG-tag 付きタンパク質の場合はN末端側にEcoR Iの制限酵素サイトを付加したプライマー (配列番号: 36) とC
- 15 末端側にFLAG-tag、終止コドンおよびHind IIIの制限酵素切断サイトを付加するようなプライマー (配列番号: 37) を用いた。6 x His-tag付きタンパク質の場合はN末端側にEcoR Iの制限酵素サイトを付加したプライマー (配列番号: 36) とC末端側に6 x His-tag、終止コドンおよびHind IIIの制限酵素切断サイトを付加するようなプライマー (配列番号: 38) を用いた。各々のプライマーペアを用
- 20 い参考例 6 に記載されているpCMV-14-SEMA4Bを鋳型にしてLA-Taq DNA Polymerase (Takara Bio社) を添加しPCR反応を行い、SEMA4B細胞外ドメインをコードするcDNA断片 (2151bp) を取得した。PCR反応は、94℃・30秒、60℃・30秒、72℃・3分を30サイクル繰り返した。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社) で回収後、pCR2.1-TOPO (Invitrogen
- 25 社) にクローニングしてpCR2.1/SEMA4B-FLAG およびpCR2.1/SEMA4B-Hisを得た。塩基配列を確認後、pCR2.1/SEMA4B-FLAG およびpCR2.1/SEMA4B-HisをそれぞれEcoR I (Takara Bio社) とHind III (Takara Bio社) とで同時消化した後、アガロースゲル電気泳動を行いQIAquick Gel Extraction KitでDNA消化断片を回収した。pFASTBAC1 (Invitrogen社) についても同様にしてDNA消化断片を回収し、

Ligation High (Toyobo社) を用いてライゲーション反応を行い、C末端にFLAG-tagを付加させたベクターpFB/SEMA-FLAGまたはC末端に6×His-tagを付加させたベクターpFB/SEMA-Hisを作製した。次に、BAC-T0-BAC Baculovirus Expression Systemの添付プロトコールに従い、組換えBacmid DNAを調製後、組換えバキュロウィルスを取得した。

組換え型SEMA4Bタンパク質の発現は、上記で得られた組換えウィルス1/100量 (v/v) をSf+細胞株 (日本農産 社) に感染させて行った。感染後、無血清培地Sf-900 II SFMを用いて27℃、100 rpmで3日間振とう培養し、組換え型タンパク質を含む上清を回収した。FLAGタグ付きタンパク質を含む培養液上清の場合はANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma社) を用い、6×Hisタグ付きタンパク質を含む培養液上清の場合はNi-NTA Superflow (QIAGEN社) を用いて分離精製し、更にSuperdex 200 pg (Amersham-Bioscience社) で精製し、組換え型SEMA4B-FLAGおよびSEMA4B-Hisを取得した。

(2) ウサギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体の作製と精製

実施例3-(1) で調製した組換え型SEMA4B-FLAGタンパク質を免疫原としてウサギポリクローナル抗体を作製した。SEMA4B-FLAGタンパク質のPBS溶液とフロインド完全アジュバントとを等量混合して作製したエマルジョンを家兎 (日本白色種、雌、3 kg) 3羽の背部皮下および皮内に0.1 mgタンパク質/1羽で免疫した。2回目以降の免疫にはフロインド不完全アジュバントに置き換えたタンパク質エマルジョンを同様に調製し、2週間毎に7回追加免疫を繰り返した。

免疫前および4回目と6回目の免疫1週後に耳静脈より採血し、SEMA4B-FLAGタンパク質をコートしたイムノプレートを用いるELISAにより血清抗体価の上昇を確認した。最終免疫の1週間後に3羽のウサギより麻酔下、頚動脈採血を行いNo. 1のウサギから65.1 ml、No. 2のウサギから79.5 ml、No. 4のウサギから68.0 mlの抗血清を取得した。これらの抗血清をPBSで2倍希釈し、遠心分離して上清を取得した後、実施例3-(1) に記載した組換え型SEMA4B-Hisタンパク質をHiTrap NHS-Activated HP (Amersham-Bioscience社) に固定化した抗原カラムに吸着させた。カラムをPBSで洗浄後、0.1 M Glycine-HCl /0.15 M NaCl (pH 3) で溶出し、溶出液を1 M Tris-HCl (pH 8) で中和した後、PBSに対して4℃で終夜透析し、ウサ

ギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体を精製取得した。

(3) ウサギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体のSEMA4B/PlexinB1結合阻害活性

SEMA4Bに対するPlexinB1の結合活性は、参考例12記載のSEMA4B/H358細胞株を用い実施例2-(2)に記載した方法に従ってフローサイトメトリー法で解析した。ウサギIgGの結合阻害活性の測定は、実施例3-(2)で取得したウサギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体No. 1、No. 2、No. 4または非免疫ウサギIgG (Jackson社) を添加して測定した。非免疫ウサギIgG 存在下で得られるPlexinB1結合活性を100%と定義し、上記ウサギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体の結合阻害活性を算出した。PlexinB1結合活性の算出には、得られた蛍光強度の中央値を用いた。

- 10 その結果、終濃度100 μ g/mlでウサギポリクローナル抗体No. 1が63%、No. 2が74%、No. 4が60%の結合阻害活性をそれぞれ示した。さらに、ウサギポリクローナル抗体No. 4のF(ab')₂断片を用いて同様の結合阻害活性を検討したところ、終濃度100 μ g/mlで73%、10 μ g/mlで30%の結合阻害活性をそれぞれ示した。

15 実施例4

ウサギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体の増殖抑制活性

- 参考例5記載のNCI-H358細胞株または参考例12記載のSEMA4B/H358細胞株を、1%牛胎仔血清 (JRH社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび25mM HEPESを含むRPMI-1640培地 (Invitrogen社) で懸濁し、1ウェル当たり 5×10^3 個の細胞密度となるように96穴平底組織培養プレート (BDファルコン社) に播種した。播種と同時に、実施例3-(2)で取得したウサギ抗SEMA4Bポリクローナル抗体No. 1、No. 2、No. 4または非免疫ウサギIgG (Jackson社) を終濃度が1 μ g/ml、10 μ g/mlまたは100 μ g/mlとなるように添加し、5%炭酸ガス気流下、37°Cで6日間培養した。培養終了後にCell Counting Kit-8 (Dojindo社) を20 μ l添加し、5%炭酸ガス気流下、
25 37°Cで90分間反応させた後、450nmおよび620nmでの吸光度の差分を測定した。抗体非存在下を陰性対照として上記ウサギポリクローナル抗体の細胞増殖抑制活性を算出した。

その結果、NCI-H358に対しては終濃度100 μ g/mlで、ウサギポリクローナル抗体No. 1が26%、No. 2が19%、No. 4が32%の増殖抑制活性をそれぞれ示し、終濃度10

$\mu\text{g/ml}$ ではNo. 4が11%の増殖抑制活性を示し、それぞれ統計学的に有意な差 ($P \leq 0.01$) を示した (表 1 0)。

SEMA4B/H358に対しては終濃度100 $\mu\text{g/ml}$ で、ウサギポリクローナル抗体のNo. 1が45%、No. 2が46%、No. 4が55%の増殖抑制活性をそれぞれ示し、終濃度10 $\mu\text{g/ml}$ ではNo. 1が11%、No. 4が21%の増殖抑制活性をそれぞれ示し、それぞれ統計学的に有意な差 ($P \leq 0.01$) を示した (表 1 1)。

非免疫ウサギIgGはどちらの細胞株に対しても統計学的に有意な増殖抑制活性を示さなかった (表 1 0、表 1 1) ことから、増殖抑制活性は、SEMA4B特異的に誘発されていることが明らかとなった。

10

〔表 1 0〕

	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞増殖活性($A_{450}-A_{620}$)	
		平均値	標準偏差
細胞非添加		0.123	0.002
抗体非存在下		1.563	0.018
非免疫ウサギIgG	100	1.539	0.047
	10	1.552	0.027
	1	1.596	0.027
ウサギポリクローナル抗体 (No.1)	100	1.164	0.048
	10	1.444	0.051
	1	1.522	0.067
ウサギポリクローナル抗体 (No.2)	100	1.267	0.029
	10	1.502	0.033
	1	1.519	0.135
ウサギポリクローナル抗体 (No.4)	100	1.066	0.016
	10	1.395	0.004
	1	1.466	0.084

〔表 1 1〕

	濃度 (μ g/ml)	細胞増殖活性($A_{450}-A_{620}$)	
		平均値	標準偏差
細胞非添加		0.124	0.001
抗体非存在下		1.561	0.048
非免疫ウサギIgG	100	1.518	0.095
	10	1.512	0.049
	1	1.532	0.045
ウサギポリクローナル抗体(No.1)	100	0.866	0.052
	10	1.382	0.028
	1	1.503	0.067
ウサギポリクローナル抗体(No.2)	100	0.844	0.037
	10	1.422	0.080
	1	1.627	0.059
ウサギポリクローナル抗体(No.4)	100	0.705	0.019
	10	1.232	0.056
	1	1.530	0.034

産業上の利用可能性

- 5 本発明に係る配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（本発明で用いられるタンパク質）と配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（本発明で用いられるレセプター）との結合を阻害する物質、〔好ましくは、上記
- 10 タンパク質と上記レセプターとの結合によりもたらされる癌細胞増殖刺激を中和する活性を有する抗体（以下、中和活性抗体と称することもある）〕は、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などとして安全に使用することができる。また、本発明で用いられるタンパク質の活性、および（または）本発明で用いられるレセプターの活性を阻害する物
- 15

質（好ましくは、中和活性抗体など）は、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖抑制剤などとして安全に使用すること

5 とができる。

請求の範囲

1. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害する物質。
- 5
2. 物質が、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体である請求項1記載の物質。
- 10
3. 物質が、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合によりもたらされる癌細胞増殖刺激を中和する活性を有する抗体である請求項1記載の物質。
- 15
4. 抗体が、モノクローナル抗体である請求項2または請求項3記載の物質。
5. 請求項1記載の物質を含有してなる癌の予防・治療剤。
- 20
6. 請求項1記載の物質を含有してなる癌細胞のアポトーシス促進剤。
7. 請求項1記載の物質を含有してなる癌細胞の増殖抑制剤。
8. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質を含有してなる癌細胞の増殖抑制剤。
- 25
9. 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質。
10. 物質が、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に

同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のリン酸化を阻害する活性を有する抗体である請求項 9 記載の物質。

- 1 1. 抗体が、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合によりもたらされる癌細胞増殖刺激を中和する活性を有する抗体である請求項 10 記載の物質。
- 1 2. 請求項 9 記載の物質を含有してなる癌の予防・治療剤。
- 10 1 3. 請求項 9 記載の物質を含有してなる癌細胞のアポトーシス促進剤。
- 1 4. 請求項 9 記載の物質を含有してなる癌細胞の増殖抑制剤。
- 1 5. (a) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、および (b) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記 (a) のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、上記 (b) のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害する物質のスクリーニング方法。
- 15 1 6. (a) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、および (b) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、上記 (a) のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、上記 (b) のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害する物質のスクリーニング用キット。
- 25 1 7. 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用い

ることを特徴とする、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質のスクリーニング方法。

- 5 18. 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する物質のスクリーニング用キット。

- 10 19. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および（または）癌細胞の増殖抑制方法。

20. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いる請求項19記載の方法。

- 20 21. 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のリン酸化を阻害することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および（または）癌細胞の増殖抑制方法。

- 25 22. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いる請求項21記載の方法。

23. 哺乳動物に対して、請求項1または請求項9記載の物質の有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、癌細胞のアポトーシス促進方法および

（または）癌細胞の増殖抑制方法。

24. 癌の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤および（または）癌細胞の増殖抑制剤を製造するための、請求項1または請求項9記載の物質の使用。

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Preventing or treating agent for cancer

<130> P04-215PCT

<150> JP 2003-427782

<151> 2003-12-24

<160> 38

<210> 1

<211> 837

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Leu Arg Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Trp Leu Ala Ala Pro Trp
      5      10      15
Gly Ala Leu Pro Pro Arg Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
      20      25      30
Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Trp Ala Leu Ser Pro Arg Ile
      35      40      45
Ser Leu Pro Leu Gly Ser Glu Arg Pro Phe Leu Arg Phe Glu Ala
      50      55      60
Glu His Ile Ser Asn Tyr Thr Ala Leu Leu Leu Ser Arg Asp Gly Arg
      65      70      75      80
Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Glu Ala Leu Phe Ala Leu Ser Ser Asn
      85      90      95
Leu Ser Phe Leu Pro Gly Gly Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Trp Gly Ala
      100      105      110
Asp Ala Glu Lys Lys Gln Gln Cys Ser Phe Lys Gly Lys Asp Pro Gln
      115      120      125
Arg Asp Cys Gln Asn Tyr Ile Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ser Gly Ser
      130      135      140
His Leu Phe Thr Cys Gly Thr Ala Ala Phe Ser Pro Met Cys Thr Tyr
      145      150      155      160
Ile Asn Met Glu Asn Phe Thr Leu Ala Arg Asp Glu Lys Gly Asn Val
      165      170      175
Leu Leu Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Asn Phe Lys
      180      185      190
Ser Thr Ala Leu Val Val Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Val Ser
      195      200      205
Ser Phe Gln Gly Asn Asp Pro Ala Ile Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg
      210      215      220
Pro Thr Lys Thr Glu Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Asp Pro Ala Phe
      225      230      235      240
Val Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Glu Ser Leu Gly Ser Leu Gln Gly Asp
      245      250      255
Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Ser Glu Thr Gly Gln Glu Phe Glu
      260      265      270
Phe Phe Glu Asn Thr Ile Val Ser Arg Ile Ala Arg Ile Cys Lys Gly
      275      280      285
Asp Glu Gly Gly Glu Arg Val Leu Gln Gln Arg Trp Thr Ser Phe Leu
      290      295      300
Lys Ala Gln Leu Leu Cys Ser Arg Pro Asp Asp Gly Phe Pro Phe Asn
      305      310      315      320
Val Leu Gln Asp Val Phe Thr Leu Ser Pro Ser Pro Gln Asp Trp Arg

```

Asp Thr Leu Phe Tyr Gly Val Phe Thr Ser Gln Trp His Arg Gly Thr
 Thr Glu Gly Ser Ala Val Cys Val Phe Thr Met Lys Asp Val Gln Arg
 Val Phe Ser Gly Leu Tyr Lys Glu Val Asn Arg Glu Thr Gln Gln Met
 Val His Arg Asp Pro Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly Ala Cys Ile
 Thr Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Leu Gln Leu Pro
 Asp Arg Val Leu Asn Phe Leu Lys Asp His Phe Leu Met Asp Gly Gln
 Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg
 Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu
 Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly
 Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly Gln
 Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala
 Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu
 Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu
 Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu
 Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp
 Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly
 Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr
 Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg
 Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr
 Gly Asp Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
 Trp Ser Leu Glu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
 Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser
 Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly
 Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val
 Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Phe Leu
 Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu
 Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu
 Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His
 Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe
 Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu

805
 Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile
 820 825 830
 Arg Asp Ser Val Val
 835

<210> 2
 <211> 2511
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 atgctgcgca ccgcatgggg cctgaggagc tggctcgccg ccccatgggg cgcgctgccg 60
 cctcggccac cgctgctgct gctcctgctg ctgctgctcc tgctgcagcc gccgcctccg 120
 acctggggcg tcagcccccg gatcagcctg cctctgggct ctgaagagcg gccattcctc 180
 agattcgaag ctgaacacat ctccaactac acagcccttc tgctgagcag ggatggcagg 240
 acctgtacg tgggtgctcg agaggccctc tttgcaacta gtagcaacct cagcttcctg 300
 ccaggcgggg agtaccagga gctgctttgg ggtgcagacg cagagaagaa acagcagtgc 360
 agcttcaagg gcaaggaccc acagcgcgac tgtcaaaact acatcaagat cctcctgccg 420
 ctacggcgca gcatcctgtt cacctgtggc acagcagcct tcagcccat gtgtacctac 480
 atcaacatgg agaacttcac cctggcaagg gacgagaagg ggaatgtcct cctggaagat 540
 ggcaaggggc gttgtccctt cgaccogaat ttcaagtcca ctgccctggt ggttgatggc 600
 gagctctaca ctggaacagt cagcagcttc caagggaatg acccggccat ctgcgcgagc 660
 caaagccttc gcccaccaa gaccgagagc tccctcaact ggctgcaaga cccagctttt 720
 gtggcctcag cctacattcc tgagagcctg ggcagcttgc aaggcgatga tgacaagatc 780
 tactttttct tcagcgagac tggccaggaa tttgagttct ttgagaacac catttgttcc 840
 cgctattgcc gcatctgcaa gggcgatgag ggtggagagc ggtgtctaca gcagcgtgg 900
 acctccttcc tcaaggccca gctgtgtgct tcacggcccg acgatggctt ccccttcaac 960
 gtgtgcagg atgtcttcac gctgagcccc agccccagg actggcgtga cacccttttc 1020
 tatggggctc tcacttccca gtggcacagg ggaactacag aaggctctgc cgtctgtgtc 1080
 ttcaaatga aggatgtgca gagagtcttc agcggcctct acaaggaggt gaaccgtgag 1140
 acacagcaga tggtaacccg tgaccacccc gtgcccacac cccggcctgg agcgtgcatc 1200
 accaaccagt cccgggaaag gaagatcaac tcctcctgct agctcccaga ccgctgtgtg 1260
 aactttctca aggaccctt cctgatggag gggcaggctc gaagccgat gctgtgctg 1320
 cagccccagg ctgcgtacca gcgctggctg gtacaccgag tccctggcct gcaccacacc 1380
 tacgatgtcc tcttcttggg cactgggtgac ggcgggctcc acaaggcagt gagcgtgggc 1440
 ccccggtgac acatcattga ggagctgcag atcttctcat cgggacagcc cgtgcagaat 1500
 ctgctcctgg acaccacag ggggtgtgtg tatgcggcct cacactcggg cgtagtccag 1560
 gtgcccattg ccaactgcag cctgtaccgg agctgtgggg actgcctcct cgccccggac 1620
 cctactgtg cttggagcgg ctccagctgc aagcacgtca gcctctacca gcctcagctg 1680
 gccaccaggc cgtggatcca ggacatcgag ggagccagcg ccaaggacct ttgcagcgcg 1740
 tcttcgggtg tgtccccgtc tttgtacca acaggggaga agccatgtga gcaagtccag 1800
 ttccagccca acacagtga cactttggcc tgcccgctcc tctccaacct ggcgaccgca 1860
 ctctggctac gcaacggggc ccccgtaaat gcctcggcct cctgccacgt gctaccact 1920
 ggggacctgc tgcgtgtggg caccacaacag ctgggggagt tccagtgtg gtcactagag 1980
 gagggttcc agcagctggt agccagctac tgcccagagg tgggtggagga cggggtggca 2040
 gaccaaacag atgagggtgg cagtgtaccc gtcattatca gcacatogcg tgtgagtga 2100
 ccagctgggt gcaaggccag ctgggggtgca gacaggtcct actggaagga gttcctgggtg 2160
 atgtgcacgc tctttgtgct ggccgtgctg ctcccagttt tattcttgct ctaccggcac 2220
 cggaacagca tgaagtctt cctgaagcag ggggaatgtg ccagcgtgca cccaagacc 2280
 tgccctgtgg tgcgtccccc tgagaccgc ccactcaacg gcctagggcc ccctagcacc 2340
 ccactcgatc accgagggtg ccagtccctg tcagacagcc ccccggggtc ccgagtcttc 2400
 actgagtcag agaagaggcc actcagcatc caagacagct tcgtggaggt atccccagt 2460
 tgccccggc cccgggtccg ccttggtcgt gagatccgtg actctgtggt g 2511

<210> 3
 <211> 3766
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3

gctctgccca	agccgaggct	gcggggccgg	cgccggcggg	aggactgcgg	tgccccgggg	60
aggggctgag	tttgccaggg	cccacttgac	cctgtttccc	acctcccggc	ccccaggtcc	120
ggaggcgggg	gccccggggg	cgactcgggg	goggaccgcg	gggocggagct	gocgcccgtg	180
agtccggccg	agccacctga	gcccagagcg	cgggacaccg	tcgctcctgc	tctccgaatg	240
ctgcgcaccg	cgatgggccc	gaggagctgg	ctcgccggcc	catggggcgc	gctgcgcctt	300
cggccaccgc	tgctgtgtgt	cctgtgtgtg	ctgtccttgc	tgagcccgcc	gcctccgacc	360
tgggcgctca	gccccgggat	cagcctgcct	ctgggctctg	aagagcggcc	attcctcaga	420
ttcgaagctg	aacacatctc	caactacaca	gccccttctg	tgagcaggga	tggcaggacc	480
ctgtacgtgg	gtgtcgcaga	ggccctcttt	gcactcagta	gcaacctcag	cttccctgcca	540
ggcggggagt	accaggagct	gctttggggg	gcagacgcag	agaagaaaca	gcagtgcagc	600
ttcaagggca	aggaccacac	gcgcgactgt	caaaactaca	tcaagatcct	cctgcgcctc	660
agcggagctc	acctgttcac	ctgtggcaca	gcagccttca	gccccatgtg	tacctacatc	720
aacatggaga	acttcaccct	ggcaagggac	gagaagggga	atgtcctcct	ggaagatggc	780
aaggggcgtt	gtcccttoga	cccgaatttc	aagtccactg	ccctgggtgt	tgatggcgag	840
ctctacactg	gaacagtcag	cagcttccaa	gggaatgacc	cggccatctc	gcggagccaa	900
agccttcggc	ccaccaagac	cgagagctcc	ctcaactggc	tgcaagacct	agcttttgtg	960
gcctcagcct	acattcctga	gagcctgggc	agcttgcaag	gcgatgatga	caagatctac	1020
tttttcttca	gcgagactgg	ccaggaattt	gagttctttg	agaacaccat	tgtgtccgcg	1080
attgcccgca	ctgtcaaggg	cgatgaggtt	ggagagcggg	tgctacagca	gcgctggacc	1140
tccttcctca	aggcccagct	gctgtgtctc	cggcccgacg	atggcttccc	cttcaacgtg	1200
ctgcaggatg	tcctcacgct	gagccccagc	ccccaggact	ggcgtgacac	ccttttctat	1260
ggggtcttca	cttcccagtg	gcacagggga	actacagaag	gctctgccgt	ctgtgtcttc	1320
acaatgaagg	atgtgcagag	agtcttcagc	ggcctctaca	aggaggtgaa	ccgtgagaca	1380
cagcagatgg	tacaccgtga	cccacccgtg	cccacacccc	ggcctggagc	gtgcatcacc	1440
aacagtgcgc	gggaaaggaa	gatcaactca	tccttcgacg	tccagaccgc	cgtgtcgaac	1500
tttctcaagg	accacttcct	gatggacggg	caggtccgaa	gocgcatgct	gctgtgcag	1560
ccccaggctc	gctaccagcg	cgtggctgtg	caccgcgtcc	ctggcctgca	ccacacctac	1620
gatgtcctct	tcctgggcac	tggtagcggc	cggctccaca	aggcagttag	cgtgggcccc	1680
cgggtgcaca	tcattgagga	gctgcagatc	ttctcatcgg	gacagcccgt	gcagaatctg	1740
ctcctggaca	cccacagggg	gctgtgtgat	gcggcctcac	actcgggcgt	agtcagggtg	1800
cccatggcca	actgcagcct	gtaccggagc	tgtggggact	gcctcctcgc	ccgggacccc	1860
tactgtgctt	ggagcggctc	cagctgcaag	tcactcagcc	tctaccagcc	tcagctggcc	1920
accaggcggt	ggatccagga	catcgaggga	gccagcgcca	aggacctttg	cagcgcgtct	1980
tcggttgtgt	ccccgtcttt	tgtaccaaca	ggggagaagc	catgtgagca	agtccagttc	2040
cagcccaaca	cagtgaacac	tttggcctgc	ccgctcctct	ccaacctggc	gacccgactc	2100
tggctacgca	acggggcccc	cgtcaatgcc	tcggcctcct	gccacgtgct	acccactggg	2160
gacctgctgc	tggtagggc	ccaacagctg	ggggagttcc	agtgtgtgtc	actagaggag	2220
ggcttcacgc	agctggtagc	cagctactgc	ccagaggtgg	tggaggacgg	ggtggcagac	2280
caaacagatg	agggtaggcag	tgtaccgctc	attatcagca	catcgcgtgt	gagtgaccca	2340
gctggtagca	agggcagctg	gggtgcagac	aggtcctact	ggaaggagtt	cctgggtgatg	2400
tgacagctct	ttgtgtgtgg	cgtgtgtctc	ccagttttat	tcttgcctta	ccggcaccgg	2460
aacagcatga	aagtcttcct	gaagcagggg	gaatgtgcca	gcgtgcaccc	caagacctgc	2520
cctgtgggtg	tgccccctga	gacccgcccc	ctcaacggcc	tagggccccc	tagcacccca	2580
ctcgatcaac	gagggtacca	gtccctgtca	gacagccccc	cgggggtccc	agtccttact	2640
gagtcagaga	agaggccact	cagcatccaa	gacagcttcg	tggaggatat	cccagtgtgc	2700
ccccggcccc	gggtccgcct	tggctcggag	atccgtgact	ctgtgggtgtg	agagctgact	2760
tccagaggac	gctgccctgg	cttcaggggc	tgtgaatgct	cggagagggt	caactggacc	2820
tccccctccg	tctgtctctt	gtggaacacg	accgtgggtg	ccggcccttg	ggagccttgg	2880
ggccagctgg	cctgtctgct	tccagtcaag	tagcgaagct	cctaccacco	agacacccaa	2940
acagccgtgg	cccagagggt	cctggccaaa	tatggggggc	tgccatagggt	ggtggaacag	3000
tgctccttat	gtaaacctag	ccctttgttt	aaaaaacaa	tccaaatgtg	aaactagaat	3060
gagagggaag	agatagcatg	gcattgcagc	cacacggctg	ctccagttca	tggcctccca	3120
ggggtgtgtg	ggatgcaccc	aaagtgggtg	cttgagacag	agttggaaac	cctcaccaac	3180
tggcctcttc	accttccaca	ttatcccgct	gccaccggct	gcccgtgtct	actgcagatt	3240
caggaccagc	ttgggctgct	tgcgttctgc	cttgccagtc	agccgaggat	gtagttgttg	3300
ctgccgtcgt	cccaccacct	cagggaccag	agggctaggt	tggcactgcg	gcctcaccac	3360
ggtcctgggc	toggacccaa	ctcctggacc	tttccagcct	gtatcaggct	gtggccacac	3420
gagaggacag	cgcgagctca	ggagagattt	cgtgacaatg	tacgcctttc	cctcagaatt	3480
cagggaagag	actgtcgcct	gccttcctcc	gttgtttcgt	gagaaccgct	gtgccccctt	3540

<210> 4
<211> 837
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5/27

385 Thr Asn Ser Ala Arg 390 Glu Arg Lys Ile Asn 395 Ser Ser Leu Gln Leu 400 Pro
 Asp Arg Val Leu 405 Asn Phe Leu Lys Asp 410 His Phe Leu Met. Asp 415 Gly Gln
 Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg
 Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu
 Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly
 465 Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly 480 Gln
 Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala
 Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu
 Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala
 Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu
 545 Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp
 Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly
 Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr
 Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg
 Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr
 625 Gly Asp Leu Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Gly Glu Phe Gln Cys
 Trp Ser Leu Glu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
 Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser
 Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly
 Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val
 705 Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Phe Leu
 Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu
 Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu
 Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His
 Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe
 785 Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu
 Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile
 Arg Asp Ser Val Val 825 830

<210> 5
 <211> 2511

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5

atgctgcgca	cgcgatggg	cctgaggagc	tggctcgcgc	cccatgggg	cgcgctgccg	60
cctcgccac	cgctgctgct	gctoctgcta	ctgctgctoc	tgctgcagcc	accgctccg	120
acctgggcgc	tcagcccccg	gatcagcctg	cctctgggct	ctgaagagcg	gccattcctc	180
agattcgaag	ctgaacacat	ctccaactac	acagcccttc	tgctgagcag	ggatggcagg	240
accctgtacg	tggtgtgctcg	agaggccctc	tttgactca	gtagcaacct	cagcttcctg	300
ccaggcgggg	agtaccagga	gctgcttttg	ggtgcagacg	cagagaagaa	acagcagtcg	360
agcttcaagg	gcaaggaccc	acagcgcgac	tgtcaaaact	acatcaagat	cctcctgccg	420
ctcagcggca	gtcacctgtt	cacctgtggc	acagcagcct	tcagcccat	gtgtacctac	480
atcaacatgg	agaacttcac	cctggcaagg	tcacgagaagg	ggaatgtcct	cctggaagat	540
ggcaagggcc	gttgtccctt	cgaccogaat	ttcaagtcca	ctgccctggt	ggttgatggc	600
gagctctaca	ctggaacagt	catcagcttc	caagggaatg	acccggccat	ctcgcggagc	660
caaagccttc	gccccaccaa	gaccgagagc	tccctcaact	ggctgcaaga	cccagctttt	720
gtggcctcag	cctacattcc	tgagagcctg	ggcagcttgc	aaggcgatga	tgacaagatc	780
tactttttct	tcagcgagac	tgccagggaa	tttgagttct	ttgagaacac	cattgtgtcc	840
cgcatggccc	gtcactgcaa	gggcgatgag	ggttgagagc	gggtgctaca	gcagcgtg	900
acctccttcc	tcaaggccca	gctgctgtgc	tcacggccc	acgatggctt	cccctcaac	960
gtgctgcagg	atgtcttcac	gctgagcccc	agccccagg	actggcgtga	cacctttt	1020
tatggggtct	tcacttccca	gtggcacagg	ggaactacag	aaggctctgc	cgtctgtgtc	1080
ttcacaatga	aggatgtgca	gagagtcttc	agcgccctct	acaaggaggt	gaacctgag	1140
acacagcaga	tggtacaccg	tgaccacccc	gtgccacac	cccgccctgg	agcgtgcac	1200
accaacagt	ccggggaag	gaagatcaac	tcacccctgc	agctcccaga	ccgctgtctg	1260
aactttctca	aggaccactt	cctgatggac	gggcaggtcc	gaagccgcac	gctgctgctg	1320
cagccccagg	ctcgtaccac	cgcgtggct	gtacaccgog	tccttggcct	gcaccacacc	1380
taogatgtcc	tcttccctgg	cactggtgac	ggccggctcc	acaaggcagt	gagcgtgggc	1440
ccccgggtgc	acatcattga	ggagctgcag	atcttctcat	cgggacagcc	cgtgcagaat	1500
ctgctcctgg	acaccacag	ggggctgctg	tatgcccct	cacactcggg	cgtagtccag	1560
gtgcccattg	ccaactgcag	cctgtaccgg	agctgtgggg	actgcctcct	cgcccgggac	1620
ccctactgtg	cttggagcgg	ctccagctgc	aagcacgtca	gcctctacca	gcctcagctg	1680
gccaccaggc	cgtggatcca	ggacatcgag	ggagccagcg	ccaaggacct	ttgcagcgcg	1740
tcttcggttg	tgtccccgtc	ttttgtacca	acaggggaga	agccatgtga	gcaagtccac	1800
ttccagccca	acacagtga	caactttggc	tgcccgctcc	tctccaacct	ggcgaccgga	1860
ctctggctac	gcaacggggc	ccccgtcaat	gcctcggcct	cctgccacgt	gctaccact	1920
ggggacctgc	tgctggtggg	cacccaacag	ctgggggagt	tccagtgtg	gtcactagag	1980
gagggtctcc	agcagctggt	agccagctac	tgccagagg	tggtggagga	cggggtggca	2040
gacaaaacag	atgagggtgg	cagtgtaccc	gtcattatca	gcacatcgcg	tgtgagtga	2100
ccagctggtg	gcaaggccag	ctgggggtga	gacaggtcct	actggaagga	gttcctggtg	2160
atgtgcacgc	tctttgtgct	ggcgtgctg	ctccagttt	tattcttgct	ctaccggcac	2220
cggaacagca	tgaagtctt	cctgaagcag	ggggaatgtg	ccagcgtgca	ccccaaagacc	2280
tgccctgtgg	tgctgcccc	tgagaccgc	ccactcaacg	gcctagggcc	ccctagcacc	2340
ccactcgatc	accgagggtg	ccagtccctg	tcagacagcc	ccccggggtc	ccgagtcctc	2400
actgagtcag	agaagaggcc	actcagcatc	caagacagct	tcgtggaggt	atccccagtg	2460
tgcccccggc	ccgggtccg	ccttggctcg	gagatccgtg	actctgtggt	g	2511

<210> 6
<211> 3766
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6

gctctgcccc	agccgaggct	gcggggccgg	cgccggccgg	aggactgcgg	tgccccggcg	60
aggggctgag	tttgccagg	cccacttgac	cctgtttccc	acctcccgcc	cccagggtcc	120
ggaggcgggg	gccccgggg	cgactcgggg	gcggaccgog	gggcggagct	gcccggctg	180
agtccggccg	agccacctga	gcccagaccg	cgggacaccg	tcgctcctgc	tctccgaatg	240
ctgcgcaccg	cgatgggcct	gaggagctgg	ctgcgcggcc	catggggcgc	gctgcgcct	300
cggccaccgc	tgctgtgct	cctgtactg	ctgctcctgc	tgagccacc	gcctccgacc	360
tgggcgctca	gccccggat	cagcctgcct	ctgggctctg	aagagcggcc	attcctcaga	420

ttogaagctg	aacacatctc	caactacaca	gccotttctg	tgagcaggga	tggcaggacc	480
ctgtacgtgg	gtgctcgaga	ggccctcttt	gcactcagta	gcaacctcag	cttcoctgcca	540
ggcggggagt	accaggagct	gcttttgggt	gcagacgcag	agaagaaaca	gcagtgagc	600
ttcaagggca	aggaccacaca	gcgcgactgt	caaaactaca	tcaagatcct	cctgcgcctc	660
agcggcagtc	acctgttcac	ctgtggcaca	gcagccttca	gccccatgtg	tacctacato	720
aacatggaga	acttcacccct	ggcaagggac	gagaagggga	atgtcctcct	ggaagatggc	780
aagggccgtt	gtcccttcga	ccogaatttc	aagtccactg	ccctgggtgt	tgatggcgag	840
ctctacactg	gaacagtcac	cagcttccaa	gggaatgacc	cggccatctc	gcggagccaa	900
agccttcgcc	ccaccaagac	cgagagctcc	ctcaactggc	tgcaagacco	agcttttgtg	960
gootcagcct	acattcctga	gagcctgggc	agcttgcaag	gcgatgatga	caagatctac	1020
tttttcttca	gcgagactgg	ccaggaattt	gagttctttg	agaacacccat	tgtgtccgcg	1080
attgcccgcga	ctgtcaagggt	cgatgagggt	ggagagcggg	tgctacagca	gcgctggacc	1140
tccttctccta	aggccagct	gctgtgctca	cggcccgagc	atggcttccc	cttcaacgtg	1200
ctgcaggatg	tcttcacgct	gagccccagc	ccccaggact	ggcgtgacac	ctttttctat	1260
gggggtcttca	cttcccagtg	gcacagggga	actacagaag	gctctgccgt	ctgtgtcttc	1320
acaatgaagg	atgtgcagag	agtcttcagc	ggcctctaca	aggaggtgaa	ccgtgagaca	1380
cagcagatgg	tacaccgtga	cccacccgtg	cccacacccc	ggcctggagc	gtgcatcacc	1440
aacagtggcc	gggaaaggaa	gatcaactca	tccctgcagc	tcccagaccg	cgtgctgaac	1500
ttttctcaagg	accacttcc	gatggacggg	caggtccgaa	gccgcatgct	gctgtgcag	1560
ccccaggctc	gctaccagcg	ogtggctgtg	caccgcgtcc	ctggcctgca	ccacacctac	1620
gatgtcctct	tcctgggcac	tggtgacggc	cggctccaca	aggcagttag	cgtgggcccc	1680
cgggtgcaca	tcattgagga	gctgcagatc	ttctcatcgg	gacagcccgt	gcagaatctg	1740
ctcctggaca	cccacagggg	gctgctgtat	gcggcctcac	actcggggct	agtccaggtg	1800
cccattggcca	actgcagcct	gtaccggagc	tgtggggact	gcctcctcgc	ccgggacccc	1860
tactgtgctt	ggagcggctc	cagctgcaag	cacgtcagcc	totaccagcc	tcagctggcc	1920
accaggccgt	ggatccagga	catcgaggga	gccagcgcca	aggaccittg	cagcgcgtct	1980
tgggtgtgtg	ccccgtcttt	tgtaccaaca	ggggagaagc	catgtgagca	agtcacgttc	2040
cagcccaaca	cagtgaacac	tttggcctgc	ccgctcctct	ccaacctggc	gacccgactc	2100
tggtacgca	acggggcccc	cgtaaatgcc	tcggcctcct	gccacgtgct	acccactggg	2160
gacctgctgc	tggtgggcac	ccaacagctg	ggggagtcc	agtgtgtgtc	actagaggag	2220
ggcttccagc	agctggtagc	cagctactgc	ccagagggtg	tggaggacgg	ggtggcagac	2280
caaacagatg	agggtggcag	tgtaccgcct	attatcagca	catcgcgtgt	gagtgcacca	2340
gctgggtggca	aggccagctg	gggtgcagac	aggtcctact	ggaaggagt	cctgggtgat	2400
tgacagctct	ttgtgctggc	cgtgctgctc	ccagttttat	tottgctcta	ccggcacccg	2460
aacagcatga	aagtcttcc	gaagcagggg	gaatgtgcca	gcgtgcaccc	caagacctgc	2520
cctgtgggtg	tgccccctga	gaccgcacca	ctcaacggcc	tagggccccc	tagcacccca	2580
ctcgatcacc	gagggtacca	gtccctgtca	gacagccccc	cggggctccc	agtcctcaot	2640
gagtcagaga	agaggccact	cagcatocaa	gacagcttcg	tggaggatat	cccagtgtgc	2700
ccccggcccc	gggtccgcct	tggtctggag	atccgtgact	ctgtgggtgt	agagctgact	2760
tccagaggac	gctgccctgg	cttcaggggc	tgtgaatgct	cggagagggt	caactggacc	2820
tcccctccgc	tctgctcttc	gtggaacacg	accgtgggtg	cggcccttg	ggagccttgg	2880
ggccagctgg	cctgctgctc	tccagtcaag	tagcgaagct	cctaccaccc	agacacccaa	2940
acagccgtgg	ccccagaggt	cctggccaaa	tatggggggc	tgccatagg	ggtggaacag	3000
tgctccttat	gtaaacctag	ccctttgttt	aaaaaacaa	tccaaatgtg	aaactagaat	3060
gagagggaag	agatagcatg	gcattgcagca	cacacggctg	ctccagttca	tggcctccca	3120
gggggtgctg	ggatgcattc	aaagtgtgtg	tctgagacag	agttggaac	cctcaccac	3180
tggcctcttc	accttccaca	ttatcccgtc	gccaccggct	gcccgtgtct	actgcagatt	3240
caggaccagc	ttgggctgcg	tgcgttctgc	cttggcagtc	agccgaggat	gtagtgtgtg	3300
ctgccgtcgt	cccaccacct	cagggaccag	agggctaggt	tggcactgcg	gccctcacca	3360
ggtcctgggc	tcggacccaa	ctcctggacc	tttccagcct	gtatcaggct	gtggccacac	3420
gagaggacag	cgcgagctca	ggagagattt	cgtgacaatg	tacgcctttc	cctcagaatt	3480
caggggaagag	actgtcgcct	gccttccctc	gttgttgctg	gagaacccgt	gtgccccttc	3540
ccaccatact	caccctcgct	ccatctttga	actcaaacac	gaggaactaa	ctgcaccctg	3600
gtcctctccc	cagtcctccg	ttcaccctcc	atccctcacc	ttcctccact	ctaagggata	3660
tcaacactgg	ccagcacagg	ggccctgaat	ttatgtgtgt	tttatacatt	ttttaataag	3720
atgcacttta	tgtcattttt	taataaagtc	tgaagaatta	ctgttt		3760

<210> 7
 <211> 837
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Leu Arg Thr Ala₅ Met Gly Leu Arg Ser₁₀ Trp Leu Ala Ala₁₅ Pro Trp
 Gly Ala Leu Pro₂₀ Pro Arg Pro Pro Leu₂₅ Leu Leu Leu Leu₃₀ Leu Leu
 Leu Leu Leu₃₅ Gln Pro Pro Pro Pro Thr Trp Ala Leu Ser₄₅ Pro Arg Ile
 Ser Leu₅₀ Pro Leu Gly Ser Glu₅₅ Glu Arg Pro Phe Leu₆₀ Arg Phe Glu Ala
 Glu₆₅ His Ile Ser Asn Tyr₇₀ Thr Ala Leu Leu₇₅ Ser Arg Asp Gly Arg₈₀
 Thr Leu Tyr Val Gly₈₅ Ala Arg Glu Ala Leu₉₀ Phe Ala Leu Ser Ser₉₅ Asn
 Leu Ser Phe Leu₁₀₀ Pro Gly Gly Glu Tyr₁₀₅ Gln Glu Leu Leu Trp Gly Ala
 Asp Ala Glu₁₁₅ Lys Lys Gln Gln Cys₁₂₀ Ser Phe Lys Gly Lys₁₂₅ Asp Pro Gln
 Arg Asp₁₃₀ Cys Gln Asn Tyr Ile₁₃₅ Lys Ile Leu Leu Pro₁₄₀ Leu Ser Gly Ser
 His Leu Phe Thr Cys₁₅₀ Gly Thr Ala Ala Phe Ser₁₅₅ Pro Met Cys Thr Tyr₁₆₀
 Ile Asn Ile Glu Asn₁₆₅ Phe Thr Leu Ala Arg Asp Glu Lys Gly Asn Val₁₇₅
 Leu Leu Glu Asp₁₈₀ Gly Lys Gly Arg Cys₁₈₅ Pro Phe Asp Pro Asn Phe Lys
 Ser Thr Ala Leu Val Val Asp Gly₂₀₀ Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Val Ser
 Ser Phe₂₁₀ Gln Gly Asn Asp Pro Ala Ile Ser Arg Ser₂₂₀ Gln Ser Leu Arg
 Pro Thr Lys Thr Glu Ser₂₃₀ Ser Leu Asn Trp Leu₂₃₅ Gln Asp Pro Ala Phe₂₄₀
 Val Ala Ser Ala Tyr₂₄₅ Ile Pro Glu Ser Leu₂₅₀ Gly Ser Leu Gln Gly Asp₂₅₅
 Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Ser₂₆₅ Glu Thr Gly Gln Glu Phe Glu
 Phe Phe Glu₂₇₅ Asn Thr Ile Val Ser Arg Ile Ala Arg Ile₂₈₅ Cys Lys Gly
 Asp Glu Gly Gly Glu Arg Val₂₉₅ Leu Gln Gln Arg Trp Thr Ser Phe Leu
 Lys Ala Gln Leu Leu Cys₃₁₀ Ser Arg Pro Asp Asp₃₁₅ Gly Phe Pro Phe Asn₃₂₀
 Val Leu Gln Asp Val Phe Thr Leu Ser Pro Ser Pro Gln Asp Trp Arg₃₃₅
 Asp Thr Leu Phe Tyr Gly Val Phe Thr Ser Gln Trp His Arg Gly Thr₃₅₀
 Thr Glu Gly Ser Ala Val Cys Val Phe Thr Met Lys Asp Val Gln Arg₃₆₅
 Val Phe Ser Gly Leu Tyr Lys Glu Val Asn Arg Glu Thr Gln Gln Met₃₈₀
 Val His Arg Asp Pro Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly Ala Cys Ile₄₀₀
 Thr Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Leu Gln Leu Pro₄₁₅
 Asp Arg Val Leu Asn Phe Leu Lys Asp His Phe Leu Met Asp Gly Gln
 Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg
 Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu

450 Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly
 465 Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly Gln
 485 Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala
 500 Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu
 515 Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala
 530 Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu
 545 Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp
 565 Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly
 580 Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr
 595 Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg
 610 Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr
 625 Gly Asp Leu Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Gly Glu Phe Gln Cys
 645 Trp Ser Leu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
 660 Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser
 675 Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly
 690 Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val
 705 Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Pro Val Leu Phe Leu
 725 Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu
 740 Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu
 755 Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His
 770 Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe
 785 Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu
 805 Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile
 820 Arg Asp Ser Val Val
 835

<210> 8

<211> 2511

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atgctgcgca	cgcgatggg	cctgaggagc	tggctcgccg	cccatgggg	cgcgctgccg	60
cctcgccac	cgtgtgtgt	gctcctgtg	ctgctgtctc	tgctgcagcc	gccgcctccg	120
acctgggcgc	tcagcccccg	gatcagccta	cctctgggct	ctgaagagcg	gccattcctc	180
agattcgaag	ctgaacacat	ctccaactac	acagcccttc	tgctgagcag	ggatggcagg	240

accctgtacg	tgggtgctcg	agaggccctc	tttgactca	gtagcaacct	cagcttcctg	300
ccaggcgggg	agtaccagga	gctgctttgg	ggtgcagacg	cagagaagaa	acagcagtgc	360
agcttcaagg	gcaaggaccc	acagcgcgac	tgtcaaaact	acatcaagat	cctcctgccg	420
ctcagcggca	gtcacctgtt	cacctgtggc	acagcagcct	tcagcccat	gtgtacctac	480
atcaacatag	agaacttcac	cctggcaagg	gacgagaagg	ggaatgttct	cctggaagat	540
ggcaagggcc	gttgtccctt	cgaccogaat	ttcaagtcca	ctgccctggt	ggttgatggc	600
gagctctaca	ctggaacagt	cagcagcttc	caagggaatg	acccggccat	ctcgcggagc	660
caaagccttc	gccccaccaa	gaccgagagc	tccctcaact	ggctgcaaga	cccagctttt	720
gtggcctcag	cctacattcc	tgagagcctg	ggcagcttgc	aaggcgatga	tgacaagatc	780
tactttttct	tcagcgcgac	tggccaggaa	tttgagttct	ttgagaacac	catttgtgtcc	840
cgcattgccc	gcattctgca	gggcgatgag	ggtggagagc	gggtgctaca	gcagcgcctg	900
acctccttcc	tcaaggccca	gctgctgtgc	tcacggcccg	acgatggctt	ccccctcaac	960
gtgtgcagct	gtgtgcttcc	gctgagcccc	agccccagg	actggcgtga	cacccttttc	1020
tatggggctt	tcacttccca	gtggcaccag	ggaactacag	aaggctctgc	cgtctgtgtc	1080
ttcacaatga	aggatgtgca	gagagtcttc	agcggcctct	acaaggaggt	gaaccgtgag	1140
acacagcaga	tggtacaccg	tgaccacccc	gtgcccacac	cccgccctgg	agcgtgcatc	1200
accaacagtg	cccgggaaag	gaagatcaac	tcattccctgc	agctccaga	ccgctgtgtg	1260
aacttcctca	aggaccactt	cctgatggac	gggcaggtcc	gaagccgcct	gctgctgctg	1320
cagccccagg	ctcgtaccac	gcgcgtggct	gtacaccgcg	tccctggcct	gcaccacacc	1380
tacagtgtcc	tcttccttgc	caactgtgac	gtcccgctcc	acaaggcagt	gagcgtgggc	1440
ccccgggtgc	acatcattga	ggagctgcag	atcttctcat	cgggacagcc	cgtgcagaat	1500
ctgctcctgg	acacccacag	ggggctgctg	tatgcggcct	cacactcggg	cgtagtccag	1560
gtgcccattg	ccaactgcag	cctgtacagg	agctgtgggg	actgcctcct	cgccccggac	1620
ccctactgtg	cttggagcgg	ctccagctgc	aagcacgtca	gcctctacca	gcctcagctg	1680
gccaccaggc	cgtggatcca	ggacatcgag	ggagccagcg	ccaaggacct	ttgcagcgcg	1740
tcttcgggtg	tgtccccgct	ttttgtacca	acaggggaga	agccatgtga	gcaagtccag	1800
ttccagccca	agacagtga	cactttggcc	tgcccgctcc	tctccaaact	ggcgaccoga	1860
ctctggctac	gcaacggggc	ccccgtcaat	gcctcggcct	cctgccacgt	gctacccact	1920
ggggacctgc	tgtctggtgg	cacccaacag	ctgggggagt	tccagtgtct	gtcactagag	1980
gagggcttcc	agcagctggt	agccagctac	tgcccagagg	tggtggagga	cgggggtggca	2040
gaccaaacag	atgagggtgg	cagtgtaccc	gtcattatca	gcacatcgcg	tgtgagtgca	2100
ccagctgggt	gcaaggccag	ctgggggtgca	gacaggtcct	actggaagga	gttcctgggt	2160
atgtgcacgc	tctttgtgct	ggcctgtgct	ctcccagttt	tattcttctg	ctaccggcac	2220
cggaacaggc	tgaagtcctt	cctgaagcag	ggggaaatgt	ccagcgtgca	ccccaaagacc	2280
tgccctgtgg	tgtgtccccc	tgagacccgc	ccactcaacg	gcctagggcc	ccctagcacc	2340
ccgctcgatc	accgagggtg	ccagtccctg	tcagacagcc	ccccggggtc	ccgagtcttc	2400
actgagtcag	agaagaggcc	actcagcatc	caagacagct	tcgtggaggt	atccccagtg	2460
tgcccccgcc	cccgggtccg	ccttggctcg	gagatccgtg	actctgtggt	g	2511

<210> 9

<211> 3766

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gctctgcccc	agccgaggct	gcggggccgg	cgccggcggg	aggactgcgg	tgcccccgcg	60
aggggctgag	tttgccaggg	cccacttgac	cctgtttccc	acctcccgcc	ccccaggtcc	120
ggaggcgggg	gccccggggg	cgactcgggg	gcggaccgcg	ggcgaggagt	gccgcccgtg	180
agtccggccg	agccacctga	gcccgcggcg	cgggacaccg	tcgctcctgc	tctccgaatg	240
ctgcgcaccg	cgatgggcct	gaggagctgg	ctgcgcggcc	catggggcgc	gctgccgcct	300
cggccaccgc	tgtgtctgct	cctgctgctg	ctgctcctgc	tgacgcggcc	gcctccgacc	360
tgggcgctca	gcccccggt	cagcctacct	ctgggctctg	aagagcggcc	attcctcaga	420
ttcgaagctg	aacacatctc	caactacaca	gccccttctg	tgagcaggga	tggcaggacc	480
ctgtacgtgg	gtgctcgaga	ggcccctttt	gcactcagta	gcaacctcag	cttcctgccg	540
ggcggggagt	accaggagct	gctttggggt	gcagacgcag	agaagaaaca	gcagtgcagc	600
ttcaaggcca	aggaccacac	gcgcgactgt	caaaactaca	tcaagatcct	cctgccgctc	660
agcggcagtc	acctgttcac	ctgtggcaca	gcagccttca	gccccatgtg	tacctacatc	720
aacatagaga	acttcaccct	ggcaaggggc	gagaaggggg	atgttctcct	ggaagatggc	780
aagggccgtt	gtcccttcga	cccgaatttc	aagtccactg	ccctggtggt	tgatggcgag	840
ctctacactg	gaacagtcag	cagcttccaa	gggaatgacc	cggccatctc	gcggagccaa	900

<400> 10
Met Leu Arg Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Trp Leu Ala Ala Pro Trp
5 10 15
Gly Ala Leu Pro Arg Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
20 25 30
Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Trp Ala Leu Ser Pro Arg Ile

Ser Leu Pro Leu Gly Ser Glu Glu Arg Pro Phe Leu Arg Phe Glu Ala
 35 40 45
 50 55 60
 Glu His Ile Ser Asn Tyr Thr Ala Leu Leu Ser Arg Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Glu Ala Leu Phe Ala Leu Ser Ser Asn
 85 90 95
 Leu Ser Phe Leu Pro Gly Gly Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Trp Gly Ala
 100 105 110
 Asp Ala Glu Lys Lys Gln Gln Cys Ser Phe Lys Gly Lys Asp Pro Gln
 115 120 125
 Arg Asp Cys Gln Asn Tyr Ile Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ser Gly Ser
 130 135 140
 His Leu Phe Thr Cys Gly Thr Ala Ala Phe Ser Pro Met Cys Thr Tyr
 145 150 155 160
 Ile Asn Met Glu Asn Phe Thr Leu Ala Arg Asp Glu Lys Gly Asn Val
 165 170 175
 Leu Leu Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Asn Phe Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ala Leu Val Val Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Val Ser
 195 200 205
 Ser Phe Gln Gly Asn Asp Pro Ala Ile Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg
 210 215 220
 Pro Thr Lys Thr Glu Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Asp Pro Ala Phe
 225 230 235 240
 Val Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Glu Ser Leu Gly Ser Leu Gln Gly Asp
 245 250 255
 Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Ser Glu Thr Gly Gln Glu Phe Glu
 260 265 270
 Phe Phe Glu Asn Thr Ile Val Ser Arg Ile Ala Arg Ile Cys Lys Gly
 275 280 285
 Asp Glu Gly Gly Glu Arg Val Leu Gln Gln Arg Trp Thr Ser Phe Leu
 290 295 300
 Lys Ala Gln Leu Leu Cys Ser Arg Pro Asp Asp Gly Phe Pro Phe Asn
 305 310 315 320
 Val Leu Gln Asp Val Phe Thr Leu Ser Pro Ser Pro Gln Asp Trp Arg
 325 330 335
 Asp Thr Leu Phe Tyr Gly Val Phe Thr Ser Gln Trp His Arg Gly Thr
 340 345 350
 Thr Glu Gly Ser Ala Val Cys Val Phe Thr Met Asn Asp Val Gln Arg
 355 360 365
 Val Phe Ser Gly Leu Tyr Lys Glu Val Asn Arg Glu Thr Gln Gln Met
 370 375 380
 Val His Arg Asp Pro Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly Ala Cys Ile
 385 390 395 400
 Thr Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Leu Gln Leu Pro
 405 410 415
 Asp Arg Val Leu Asn Phe Leu Lys Asp His Phe Leu Met Asp Gly Gln
 420 425 430
 Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg
 435 440 445
 Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu
 450 455 460
 Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly
 465 470 475 480
 Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly Gln
 485 490 495
 Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala
 500 505 510
 Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu

Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala
 515 520 525
 530 535 540
 Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu
 545 550 555 560
 Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp
 565 570 575
 Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly
 580 585 590
 Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr
 595 600 605
 Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg
 610 615 620
 Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr
 625 630 635 640
 Gly Asp Leu Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Gly Glu Phe Gln Cys
 645 650 655
 Trp Ser Leu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
 660 665 670
 Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser
 675 680 685
 Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly
 690 695 700
 Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val
 705 710 715 720
 Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Phe Leu
 725 730 735
 Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu
 740 745 750
 Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu
 755 760 765
 Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His
 770 775 780
 Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe
 785 790 795 800
 Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu
 805 810 815
 Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile
 820 825 830
 Arg Asp Ser Val Val
 835

<210> 11

<211> 2511

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atgctgcgca	ccgogatggg	cctgaggagc	tggctcgccg	cccatgggg	cgcgctgccg	60
cctcgccac	cgctgctgct	gctcctgctg	ctgctgctcc	tgctgcagcc	gccgcctccg	120
acctggggcg	tcagcccccg	gatcagcctg	cctctgggct	ctgaagagcg	gccattcctc	180
agattcgaag	ctgaacacat	ctccaactac	acagcccttc	tgctgagcag	ggatggcagg	240
accctgtacg	tgggtgctcg	agaggccctc	tttgcaactca	gtagcaacct	cagcttcctg	300
ccaggcgggg	agtaccagga	gctgctttgg	ggtgcagacg	cagagaagaa	acagcagtg	360
agcttcaagg	gcaaggaccc	acagcgcgac	tgtaaaaact	acatcaagat	cctcctgcg	420
ctcagcgcca	gtcacctgtt	cacctgtggc	acagcagcct	tcagcccat	gtgtacctac	480
atcaacatgg	agaacttcac	cctggcaagg	gacgagaagg	ggaatgtcct	cctggaagat	540
ggcaagggcc	gttgtccctt	cgaccggaat	ttcaagtcca	ctgccctgg	ggttgatggc	600
gagctctaca	ctggaacagt	cagcagcttc	caagggaatg	acccggccat	ctcgcgagc	660
caaagccttc	gccccaccaa	gaccgagagc	tooctcaact	ggctgcaaga	cccagctttt	720

gtggcctcag	cctacattcc	tgagagcctg	ggcagcttgc	aaggcgatga	tgacaagatc	780
tactttttct	tcagcgagac	tggccaggaa	tttgagttct	ttgagaacac	cattgtgtcc	840
cgcattgccc	gcattctgaa	gggcgatgag	ggtggagagc	gggtgctaca	gcagcgctgg	900
acctccttcc	tcaaggccca	gctgctgtgc	tcacggcccc	acgatggctt	ccccttcaac	960
gtgctgcagg	atgtcttcac	gctgagcccc	agcccccagg	actggcgtga	caccttttcc	1020
tatggggtct	tcacttccca	gtggcacagg	ggaactacag	aaggctctgc	cgtctgtgtc	1080
ttcacaatga	atgatgtgca	gagagtcttc	agcggcctct	acaaggaggt	gaaccgtgag	1140
acacagcaga	tggtacaccg	tgacccaccc	gtgcccacac	cccggcctgg	agcgtgcac	1200
accaacagtg	cccgggaaag	gaagatcaac	tcattccctg	agctcccaga	ccgctgtctg	1260
aactttctca	aggaccactt	cctgatggac	gggcaggctc	gaagccgcac	gctgctgctg	1320
cagccccagg	ctcgtaccca	gcgctgggt	gtacacogcg	tccctggcct	gcaccacacc	1380
taogattgtc	tcttcttggg	cactgggtgac	ggccggctcc	acaaggcagt	gagcgtgggc	1440
ccccgggtgc	acatcttga	ggagctgca	atcttctcat	ogggacagcc	cgtgcagaat	1500
ctgctcctgg	acacccacag	ggggctgctg	tatgcggcct	cacactcggg	cgtagtccag	1560
gtgcccattg	ccaactgcag	cctgtaccgg	agctgtgggg	actgcctcct	cgcccgggac	1620
ccctactgtg	cttggagcgg	ctccagctgc	aagcacgtca	gcctctacca	gcctcagctg	1680
gccaccaggc	cgtggatcca	ggacatcgag	ggagccagcg	ccaaggacct	ttgcagcgcg	1740
tcttcgggtg	tgtccccgtc	ttttgtacca	acaggggaga	agccatgtga	gcaagtccag	1800
ttccagccca	acacagtga	cactttggcc	tgcccgctcc	tctccaacct	ggcgaccoga	1860
ctctggctac	gcaacggggc	ccccgtcaat	gcctcgccct	cttgcacagt	gctaccacac	1920
ggggacactg	tgctgttggg	cacccaacag	ctgggggagt	tccagtgtct	gtcactagag	1980
gagggtctcc	agcagctggt	agccagctac	tgcccagagg	tggtggagga	cggggtggca	2040
gaccaaacag	atgagggtgg	cagtgtaccc	gtcattatca	gcacatcgcg	tgtgagtga	2100
ccagctggtg	gcaaggccag	ctgggggtga	gacaggctct	actggaagga	gttcctgggt	2160
atgtgcacgc	tctttgtgct	ggcogtgcct	ctcccagttt	tattcttgc	ctaccggcac	2220
cggaacagca	tgaaagtctt	cctgaagcag	ggggaatgtg	ccagcgtgca	ccccagacc	2280
tgccctgtgg	tgctgcccc	tgagaccogc	ccactcaacg	gcctagggcc	ccctagacc	2340
ccactcgatc	accgagggtg	ccagtccctg	tcagacagcc	ccccggggtc	ccgagtcttc	2400
actgagtcag	agaagaggcc	actcagcatc	caagacagct	tcgtggaggt	atccccagtg	2460
tgcccccgcc	cccgggtccg	ccttggctcg	gagatccgtg	actctgtggt	g	2511

<210> 12

<211> 3766

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gctctgcccc	agccgaggct	gcggggccgg	cgccggcggg	aggactgogg	tgcccccggg	60
aggggctgag	tttgccaggg	cccacttgac	cctgtttccc	acctcccgcc	ccccaggctc	120
ggaggcgggg	gcccccgggg	cgactcgggg	cgggaccgcg	ggcgaggagt	gcccggcgtg	180
agtcggcgcc	agccacctga	gcccagaccg	cgggacaccg	tcgctcctgc	tctccgaatg	240
ctgcgcaccg	cgatgggcct	gaggagctgg	ctgcgcggcc	catggggcgc	gctgcgcct	300
cggccaccgc	tgctgtgctg	cctgtgctg	ctgctcctgc	tgacgcggcc	gcctccgacc	360
tgggcgctca	gcccccggt	cagcctgcct	ctgggctctg	aagagcgggc	attcctcaga	420
ttcgaagctg	aacacatctc	caactacaca	gccccttctg	tgagcaggga	tggcaggacc	480
ctgtacgtgg	gtgctcgaga	ggccctcttt	gcaactcagta	gcaacctcag	cttcttgcca	540
ggcggggagt	accaggagct	gctttgggg	cgagacgcag	agaagaaaca	gcagtgcagc	600
ttcaagggca	aggaccacaca	gcgcgactgt	caaaactaca	tcaagatcct	cctgcccgtc	660
agcggcattc	acctgttcac	ctgtggcaca	gcagccttca	gccccatgtg	tacctacatc	720
aacatggaga	acttcaccct	ggcaagggg	gagaagggga	atgtcctcct	ggaagatggc	780
aaggggcgtt	gtcccttcga	cccgaatttc	aagtccactg	ccctgggtgg	tgatggcgag	840
ctctacactg	gaacagtcag	cagcttccaa	gggaatgacc	cggccatctc	gcggagccaa	900
agccttcgcc	ccaccaagac	cgagagctcc	ctcaactggc	tgcaagaccc	agcttttctg	960
gcctcagcct	acattcctga	gagcctgggc	agcttgcagg	gcgatgatga	caagatctac	1020
tttttcttca	gcgagactgg	ccagggaatt	gagttctttg	agaacaccat	tgtgtccgcg	1080
attgcccgcg	tctgcaaggg	cgatgagggt	ggagagcggg	tgctacagca	gcgctggacc	1140
tccttcttca	aggcccagct	gctgtgctca	cggcccagcg	atggcttccc	cttcaacgtg	1200
ctgcaggatg	tcttcacgct	gagcccagc	cccaggact	ggcgtgacac	ccitttctat	1260
ggggctcttca	cttcccagtg	gcacagggga	actacagaag	gctctgccgt	ctgtgtcttc	1320
acaatgaatg	atgtgcagag	agtcttcagc	ggcctctaca	aggaggtgaa	ccgtgagaca	1380

cagcagatgg	tacaccgtga	cccacccgtg	cccacacccc	ggcctgggagc	gtgcatcacc	1440
aacagtggcc	gggaaaggaa	gatcaactca	tccctgcagc	tcccagaccg	ogtgcitgaac	1500
tttctcaagg	accacttcct	gatggacggg	caggtccgaa	gocgcatgct	gotgctgcag	1560
ccccaggctc	gctaccagcg	cgtggctgta	caccgcgtcc	ctggcctgca	ccacacctac	1620
gatgtcctct	tcctgggcac	tggtgacggc	cggctccaca	aggcagttag	cgtggggcccc	1680
cgggtgcaca	tcattgagga	gctgcagatc	ttotcatcgg	gacagcccg	gcagaatctg	1740
ctcctggaca	cccacagggg	gctgctgtat	gocggcctac	actcgggcgt	agtccagggtg	1800
cccattggcca	actgcagcct	gtaccggagc	tgtggggact	gcctcctcgc	ccgggacccc	1860
tactgtgctt	ggagcgggctc	cagctgcaag	cacgtcagcc	tctaccagcc	tcagctggcc	1920
accaggccgt	ggatccagga	catcgaggga	gccagcgcca	aggacctttg	cagcgcgtct	1980
tcggttggtg	ccccgtcttt	tgtaccaaca	ggggagaagc	catgtgagca	agtccagttc	2040
cagcccaaca	tcctggaacac	tttggcctct	ccgctcctct	ccaacctggc	gacctgactc	2100
tggctacgca	acggggcccc	cgtcaatgcc	tcggcctcct	gccacgtgct	acctagctggg	2160
gacctgctgc	tggtgggcac	ccaacagctg	ggggagttcc	agtgcctggc	actagaggag	2220
ggcttccagc	agctggtagc	cagctactgc	ccagagggtg	tggaggacgg	ggtggcagac	2280
caaacagatg	agggtggcag	tgtaccgctc	attatcagca	catcgcgtgt	gagtgcacca	2340
gctggtggca	aggccagctg	gggtgcagac	aggctcctact	ggaaggagtt	cctggigtatg	2400
tgcacgctct	ttgtgctggc	cgtgctgctc	ccagttttat	tcttgctcta	ccggcaccgg	2460
aacagcatga	aagtcttcct	gaagcagggg	gaatgtgcca	gcgtgcaccc	caagacctgc	2520
cctgtggtgc	tgccccctga	gacctggcca	ctcaacggcc	tagggccccc	tagcacccca	2580
ctcgatcacc	gagggtacca	gtccctgtca	gacagccccc	cggggctcccg	agtcttcaact	2640
gagtcagaga	agaggccact	cagcatccaa	gacagcttcg	tggaggatc	cccagttgtc	2700
ccccggcccc	gggtccgcct	tggctcggag	atccgtgact	ctgtggtgtg	agagctgact	2760
tccagaggac	gctgccctgg	cttcaggggc	tgtgaatgct	cggagagggt	caactggacc	2820
tcccctccgc	tctgctcttc	gtggaacacg	accgtgggtg	ccggcccttg	ggagccttgg	2880
ggcagctgg	cctgctgctc	tcagtcgaag	tagcgaagct	cctaccaccc	agacacccaa	2940
acagccgtg	cccagagggt	cctggccaaa	tatggggggc	tgcttaggtt	ggtggaacag	3000
tgctccttat	gtaaactgag	ccctttgttt	aaaaaacaa	tccaaatgtg	aaactagaat	3060
gagagggaag	agatagcatg	gcatgcagca	cacacggctg	ctccagttca	tggcctccca	3120
gggtgctgg	ggatgcatcc	aaagtgggtg	tctgagacag	agttggaac	cctcaccaac	3180
tggcctcttc	accttccaca	ttatcccgct	gccaccggct	gccctgtctc	actgcagatt	3240
caggaccagc	ttgggctgcg	tgcgttctgc	cttgccagtc	agccgaggat	gtagttgttg	3300
ctgcgctcgt	cccaccacct	cagggaccag	agggttaggt	tggcactgcg	gccctcacca	3360
ggtcctgggc	tcggacccaa	ctcctggacc	tttccagcct	gtatcaggct	gtggccacac	3420
gagaggacag	cgcgagctca	ggagagattt	cgtgacaatg	tacgcctttc	cctcagaatt	3480
cagggaagag	actgtcgcct	gccttctctc	gttgttgctg	gagaacccgt	gtgccccttc	3540
ccaccatata	caccctcgct	ccatctttga	actcaaacac	gaggaactaa	ctgcaccctg	3600
gtcctctccc	cagtccccag	ttcaccctcc	atccctcacc	ttcctccact	ctaagggata	3660
tcaaacactgc	ccagcacagg	ggccctgaat	ttatgtggtt	tttatacatt	ttttaataag	3720
atgcacttta	tgtcattttt	taataaagtc	tgaagaattg	ctgttt		3766

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 13

cagtgccaac ctagccctot

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 14
tctcccgatc caaccgtgac 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 15
caacaactac atcctcggct 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 16
tcggctocta catcaacaac 20

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 17
cctcgcccg gaccctact gtgc 24

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 18
cttggcgctg gctccctcga tgcctg 27

<210> 19
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 19
aattgaattc atgctgcgca ccgcgatg 28

<210> 20
<211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 20
 aagctctaga caccacagag tcacggatct 30

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 21
 aagctctaga tcacaccaca gagtcacgga 30

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Cys
 5 10

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly Glu Lys Pro Cys
 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Pro Leu Asp His Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Cys
 5 10 15

<210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Ser Arg Val Phe Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Cys
 5 10

<210> 26
 <211> 2135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Met Pro Ala Leu Gly Pro Ala Leu Leu Gln Ala Leu Trp Ala Gly Trp
 Val Leu Thr Leu Gln Pro Leu Pro Pro Thr Ala Phe Thr Pro Asn Gly
 Thr Tyr Leu Gln His Leu Ala Arg Asp Pro Thr Ser Gly Thr Leu Tyr
 Leu Gly Ala Thr Asn Phe Leu Phe Gln Leu Ser Pro Gly Leu Gln Leu
 Glu Ala Thr Val Ser Thr Gly Pro Val Leu Asp Ser Arg Asp Cys Leu
 Pro Pro Val Met Pro Asp Glu Cys Pro Gln Ala Gln Pro Thr Asn Asn
 Pro Asn Gln Leu Leu Leu Val Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Cys Gly
 Ser Val His Gln Gly Val Cys Glu Gln Arg Arg Leu Gly Gln Leu Glu
 Gln Leu Leu Arg Pro Glu Arg Pro Gly Asp Thr Gln Tyr Val Ala
 Ala Asn Asp Pro Ala Val Ser Thr Val Gly Leu Val Ala Gln Gly Leu
 Ala Gly Glu Pro Leu Leu Phe Val Gly Arg Gly Tyr Thr Ser Arg Gly
 Val Gly Gly Gly Ile Pro Pro Ile Thr Thr Arg Ala Leu Trp Pro Pro
 Asp Pro Gln Ala Ala Phe Ser Tyr Glu Glu Thr Ala Lys Leu Ala Val
 Gly Arg Leu Ser Glu Tyr Ser His His Phe Val Ser Ala Phe Ala Arg
 Gly Ala Ser Ala Tyr Phe Leu Phe Leu Arg Arg Asp Leu Gln Ala Gln
 Ser Arg Ala Phe Arg Ala Tyr Val Ser Arg Val Cys Leu Arg Asp Gln
 His Tyr Tyr Ser Tyr Val Glu Leu Pro Leu Ala Cys Glu Gly Gly Arg
 Tyr Gly Leu Ile Gln Ala Ala Ala Val Ala Thr Ser Arg Glu Val Ala
 His Gly Glu Val Leu Phe Ala Ala Phe Ser Ser Ala Ala Pro Pro Thr
 Val Gly Arg Pro Pro Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ala
 Leu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Glu Val Asp Arg Leu Ala Asn Arg Thr
 Arg Asp Ala Cys Tyr Thr Arg Glu Gly Arg Ala Glu Asp Gly Thr Glu
 Val Ala Tyr Ile Glu Tyr Asp Val Asn Ser Asp Cys Ala Gln Leu Pro
 Val Asp Thr Leu Asp Ala Tyr Pro Cys Gly Ser Asp His Thr Pro Ser
 Pro Met Ala Ser Arg Val Pro Leu Glu Ala Thr Pro Ile Leu Glu Trp
 Pro Gly Ile Gln Leu Thr Ala Val Ala Val Thr Met Glu Asp Gly His
 Thr Ile Ala Phe Leu Gly Asp Ser Gln Gly Gln Leu His Arg Val Tyr
 Leu Gly Pro Gly Ser Asp Gly His Pro Tyr Ser Thr Gln Ser Ile Gln
 Gln Gly Ser Ala Val Ser Arg Asp Leu Thr Phe Asp Gly Thr Phe Glu

His Leu Tyr Val Met Thr Gln Ser Thr Leu Leu Lys Val Pro Val Ala
 465 470 475 480
 Ser Cys Ala Gln His Leu Asp Cys Ala Ser Cys Leu Ala His Arg Asp
 485 490 495
 Pro Tyr Cys Gly Trp Cys Val Leu Leu Gly Arg Cys Ser Arg Arg Ser
 500 505 510
 Glu Cys Ser Arg Gly Gln Gly Pro Glu Gln Trp Leu Trp Ser Phe Gln
 515 520 525
 Pro Glu Leu Gly Cys Leu Gln Val Ala Ala Met Ser Pro Ala Asn Ile
 530 535 540
 Ser Arg Glu Glu Thr Arg Glu Val Phe Leu Ser Val Pro Asp Leu Pro
 545 550 555 560
 Pro Leu Trp Pro Gly Glu Ser Tyr Ser Cys His Phe Gly Glu His Gln
 565 570 575
 Ser Pro Ala Leu Leu Thr Gly Ser Gly Val Met Cys Pro Ser Pro Asp
 580 585 590
 Pro Ser Glu Ala Pro Val Leu Pro Arg Gly Ala Asp Tyr Val Ser Val
 595 600 605
 Ser Val Glu Leu Arg Phe Gly Ala Val Val Ile Ala Lys Thr Ser Leu
 610 615 620
 Ser Phe Tyr Asp Cys Val Ala Val Thr Glu Leu Arg Pro Ser Ala Gln
 625 630 635 640
 Cys Gln Ala Cys Val Ser Ser Arg Trp Gly Cys Asn Trp Cys Val Trp
 645 650 655
 Gln His Leu Cys Thr His Lys Ala Ser Cys Asp Ala Gly Pro Met Val
 660 665 670
 Ala Ser His Gln Ser Pro Leu Val Ser Pro Asp Pro Pro Ala Arg Gly
 675 680 685
 Gly Pro Ser Pro Ser Pro Pro Thr Ala Pro Lys Ala Leu Ala Thr Pro
 690 695 700
 Ala Pro Asp Thr Leu Pro Val Glu Pro Gly Ala Pro Ser Thr Ala Thr
 705 710 715 720
 Ala Ser Asp Ile Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Leu Leu Ser Pro Trp
 725 730 735
 Gly Pro Trp Ala Gly Ser Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Ser Thr Gly
 740 745 750
 Ser Pro Leu His Glu Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Gln Asn Gly Pro
 755 760 765
 Gly Thr Ala Val Pro Ala Pro Thr Asp Phe Arg Pro Ser Ala Thr Pro
 770 775 780
 Glu Asp Leu Leu Ala Ser Pro Leu Ser Pro Ser Glu Val Ala Ala Val
 785 790 795 800
 Pro Pro Ala Asp Pro Gly Pro Glu Ala Leu His Pro Thr Val Pro Leu
 805 810 815
 Asp Leu Pro Pro Ala Thr Val Pro Ala Thr Thr Phe Pro Gly Ala Met
 820 825 830
 Gly Ser Val Lys Pro Ala Leu Asp Trp Leu Thr Arg Glu Gly Gly Glu
 835 840 845
 Leu Pro Glu Ala Asp Glu Trp Thr Gly Gly Asp Ala Pro Ala Phe Ser
 850 855 860
 Thr Ser Thr Leu Leu Ser Gly Asp Gly Asp Ser Ala Glu Leu Glu Gly
 865 870 875 880
 Pro Pro Ala Pro Leu Ile Leu Pro Ser Ser Leu Asp Tyr Gln Tyr Asp
 885 890 895
 Thr Pro Gly Leu Trp Glu Leu Glu Glu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Ser
 900 905 910
 Cys Pro Cys Val Glu Ser Val Gln Gly Ser Thr Leu Met Pro Val His
 915 920 925
 Val Glu Arg Glu Ile Arg Leu Leu Gly Arg Asn Leu His Leu Phe Gln
 930 935 940

Asp Gly Pro Gly Asp Asn Glu Cys Val Met Glu Leu Glu Gly Leu Glu
 945 950 955 960
 Val Val Val Glu Ala Arg Val Glu Cys Glu Pro Pro Pro Asp Thr Gln
 965 970 975
 Cys His Val Thr Cys Gln Gln His Gln Leu Ser Tyr Glu Ala Leu Gln
 980 985 990
 Pro Glu Leu Arg Val Gly Leu Phe Leu Arg Arg Ala Gly Arg Leu Arg
 995 1000 1005
 Val Asp Ser Ala Glu Gly Leu His Val Val Leu Tyr Asp Cys Ser Val
 1010 1015 1020
 Gly His Gly Asp Cys Ser Arg Cys Gln Thr Ala Met Pro Gln Tyr Gly
 1025 1030 1035 1040
 Cys Val Trp Cys Glu Gly Glu Arg Pro Arg Cys Val Thr Arg Glu Ala
 1045 1050 1055
 Cys Gly Glu Ala Glu Ala Val Ala Thr Gln Cys Pro Ala Pro Leu Ile
 1060 1065 1070
 His Ser Val Glu Pro Leu Thr Gly Pro Val Asp Gly Gly Thr Arg Val
 1075 1080 1085
 Thr Ile Arg Gly Ser Asn Leu Gly Gln His Val Gln Asp Val Leu Gly
 1090 1095 1100
 Met Val Thr Val Ala Gly Val Pro Cys Ala Val Asp Ala Gln Glu Tyr
 1105 1110 1115 1120
 Glu Val Ser Ser Ser Leu Val Cys Ile Thr Gly Ala Ser Gly Glu Glu
 1125 1130 1135
 Val Ala Gly Ala Thr Ala Val Glu Val Pro Gly Arg Gly Arg Gly Val
 1140 1145 1150
 Ser Glu His Asp Phe Ala Tyr Gln Asp Pro Lys Val His Ser Ile Phe
 1155 1160 1165
 Pro Ala Arg Gly Pro Arg Ala Gly Gly Thr Arg Leu Thr Leu Asn Gly
 1170 1175 1180
 Ser Lys Leu Leu Thr Gly Arg Leu Glu Asp Ile Arg Val Val Val Gly
 1185 1190 1195 1200
 Asp Gln Pro Cys His Leu Leu Pro Glu Gln Ser Glu Gln Leu Arg
 1205 1210 1215
 Cys Glu Thr Ser Pro Arg Pro Thr Pro Ala Thr Leu Pro Val Ala Val
 1220 1225 1230
 Trp Phe Gly Ala Thr Glu Arg Arg Leu Gln Arg Gly Gln Phe Lys Tyr
 1235 1240 1245
 Thr Leu Asp Pro Asn Ile Thr Ser Ala Gly Pro Thr Lys Ser Phe Leu
 1250 1255 1260
 Ser Gly Gly Arg Glu Ile Cys Val Arg Gly Gln Asn Leu Asp Val Val
 1265 1270 1275 1280
 Gln Thr Pro Arg Ile Arg Val Thr Val Val Ser Arg Met Leu Gln Pro
 1285 1290 1295
 Ser Gln Gly Leu Gly Arg Arg Arg Arg Val Val Pro Glu Thr Ala Cys
 1300 1305 1310
 Ser Leu Gly Pro Ser Cys Ser Ser Gln Gln Phe Glu Glu Pro Cys His
 1315 1320 1325
 Val Asn Ser Ser Gln Leu Ile Thr Cys Arg Thr Pro Ala Leu Pro Gly
 1330 1335 1340
 Leu Pro Glu Asp Pro Trp Val Arg Val Glu Phe Ile Leu Asp Asn Leu
 1345 1350 1355 1360
 Val Phe Asp Phe Ala Thr Leu Asn Pro Thr Pro Phe Ser Tyr Glu Ala
 1365 1370 1375
 Asp Pro Thr Leu Gln Pro Leu Asn Pro Glu Asp Pro Thr Met Pro Phe
 1380 1385 1390
 Arg His Lys Pro Gly Ser Val Phe Ser Val Glu Gly Glu Asn Leu Asp
 1395 1400 1405
 Leu Ala Met Ser Lys Glu Glu Val Val Ala Met Ile Gly Asp Gly Pro
 1410 1415 1420

Cys Val Val Lys Thr Leu Thr Arg His His Leu Tyr Cys Glu Pro Pro
 1425 1430 1435 1440
 Val Glu Gln Pro Leu Pro Arg His His Ala Leu Arg Glu Ala Pro Asp
 1445 1450 1455
 Ser Leu Pro Glu Phe Thr Val Gln Met Gly Asn Leu Arg Phe Ser Leu
 1460 1465 1470
 Gly His Val Gln Tyr Asp Gly Glu Ser Pro Gly Ala Phe Pro Val Ala
 1475 1480 1485
 Ala Gln Val Gly Leu Gly Val Gly Thr Ser Leu Leu Ala Leu Gly Val
 1490 1495 1500
 Ile Ile Ile Val Leu Met Tyr Arg Arg Lys Ser Lys Gln Ala Leu Arg
 1505 1510 1515 1520
 Asp Tyr Lys Lys Val Gln Ile Gln Leu Glu Asn Leu Glu Ser Ser Val
 1525 1530 1535
 Arg Asp Arg Cys Lys Lys Glu Phe Thr Asp Leu Met Thr Glu Met Thr
 1540 1545 1550
 Asp Leu Thr Ser Asp Leu Leu Gly Ser Gly Ile Pro Phe Leu Asp Tyr
 1555 1560 1565
 Lys Val Tyr Ala Glu Arg Ile Phe Phe Pro Gly His Arg Glu Ser Pro
 1570 1575 1580
 Leu His Arg Asp Leu Gly Val Pro Glu Ser Arg Arg Pro Thr Val Glu
 1585 1590 1595 1600
 Gln Gly Leu Gly Gln Leu Ser Asn Leu Leu Asn Ser Lys Leu Phe Leu
 1605 1610 1615
 Thr Lys Phe Ile His Thr Leu Glu Ser Gln Arg Thr Phe Ser Ala Arg
 1620 1625 1630
 Asp Arg Ala Tyr Val Ala Ser Leu Leu Thr Val Ala Leu His Gly Lys
 1635 1640 1645
 Leu Glu Tyr Phe Thr Asp Ile Leu Arg Thr Leu Leu Ser Asp Leu Val
 1650 1655 1660
 Ala Gln Tyr Val Ala Lys Asn Pro Lys Leu Met Leu Arg Arg Thr Glu
 1665 1670 1675 1680
 Thr Val Val Glu Lys Leu Leu Thr Asn Trp Met Ser Ile Cys Leu Tyr
 1685 1690 1695
 Thr Phe Val Arg Asp Ser Val Gly Glu Pro Leu Tyr Met Leu Phe Arg
 1700 1705 1710
 Gly Ile Lys His Gln Val Asp Lys Gly Pro Val Asp Ser Val Thr Gly
 1715 1720 1725
 Lys Ala Lys Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Arg Leu Leu Arg Glu Asp Val
 1730 1735 1740
 Glu Tyr Arg Pro Leu Thr Leu Asn Ala Leu Leu Ala Val Gly Pro Gly
 1745 1750 1755 1760
 Ala Gly Glu Ala Gln Gly Val Pro Val Lys Val Leu Asp Cys Asp Thr
 1765 1770 1775
 Ile Ser Gln Ala Lys Glu Lys Met Leu Asp Gln Leu Tyr Lys Gly Val
 1780 1785 1790
 Pro Leu Thr Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Leu Asp Val Glu Trp Arg
 1795 1800 1805
 Ser Gly Val Ala Gly His Leu Ile Leu Ser Asp Glu Asp Val Thr Ser
 1810 1815 1820
 Glu Val Gln Gly Leu Trp Arg Arg Leu Asn Thr Leu Gln His Tyr Lys
 1825 1830 1835 1840
 Val Pro Asp Gly Ala Thr Val Ala Leu Val Pro Cys Leu Thr Lys His
 1845 1850 1855
 Val Leu Arg Glu Asn Gln Asp Tyr Val Pro Gly Glu Arg Thr Pro Met
 1860 1865 1870
 Leu Glu Asp Val Asp Glu Gly Gly Ile Arg Pro Trp His Leu Val Lys
 1875 1880 1885
 Pro Ser Asp Glu Pro Glu Pro Pro Arg Pro Arg Arg Gly Ser Leu Arg
 1890 1895 1900

Gly Gly Glu Arg Glu Arg Ala Lys Ala Ile Pro Glu Ile Tyr Leu Thr
 1905 1910 1915 1920
 Arg Leu Leu Ser Met Lys Gly Thr Leu Gln Lys Phe Val Asp Asp Leu
 1925 1930 1935
 Phe Gln Val Ile Leu Ser Thr Ser Arg Pro Val Pro Leu Ala Val Lys
 1940 1945 1950
 Tyr Phe Phe Asp Leu Leu Asp Glu Gln Ala Gln Gln His Gly Ile Ser
 1955 1960 1965
 Asp Gln Asp Thr Ile His Ile Trp Lys Thr Asn Ser Leu Pro Leu Arg
 1970 1975 1980
 Phe Trp Ile Asn Ile Ile Lys Asn Pro Gln Phe Val Phe Asp Val Gln
 1985 1990 1995 2000
 Thr Ser Asp Asn Met Asp Ala Val Leu Leu Val Ile Ala Gln Thr Phe
 2005 2010 2015
 Met Asp Ala Cys Thr Leu Ala Asp His Lys Leu Gly Arg Asp Ser Pro
 2020 2025 2030
 Ile Asn Lys Leu Leu Tyr Ala Arg Asp Ile Pro Arg Tyr Lys Arg Met
 2035 2040 2045
 Val Glu Arg Tyr Tyr Ala Asp Ile Arg Gln Thr Val Pro Ala Ser Asp
 2050 2055 2060
 Gln Glu Met Asn Ser Val Leu Ala Glu Leu Ser Trp Asn Tyr Ser Gly
 2065 2070 2075 2080
 Asp Leu Gly Ala Arg Val Ala Leu His Glu Leu Tyr Lys Tyr Ile Asn
 2085 2090 2095
 Lys Tyr Tyr Asp Gln Ile Ile Thr Ala Leu Glu Glu Asp Gly Thr Ala
 2100 2105 2110
 Gln Lys Met Gln Leu Gly Tyr Arg Leu Gln Gln Ile Ala Ala Val
 2115 2120 2125
 Glu Asn Lys Val Thr Asp Leu
 2130 2135

<210> 27
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 27
 gcaatgccac agtcctatcc cttaccag

28

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 28
 ggccggcccg acgcagaaac ag

22

<210> 29
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 29
acatcagccg agaggagacg agggaggtt 29

<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 30
acggggcggc tggctgtgag aat 23

<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 31
cggctagcga agcctgggtcc tcctctg 27

<210> 32
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 32
cggatccgcg ctctogccgt catactgc 28

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 33
cgggatccca aatottgtga cacacctccc 30

<210> 34
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 34
caagctttca tttaccgga gacagggaga 30

<210> 35

<211> 7308
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35

gccccggccga	cgccggccttg	tctcctttgt	tccccggcgt	ggcagcgccg	cgccgggaggg	60
gogggcagcg	ggcgagctt	tccgcccctc	ggtctccggg	taacagctgc	ggctccacca	120
gaccocgggga	gaggccgctg	cgcgcggagc	ccgagcccgg	agcggccgac	gcccgcctcg	180
gcgcgcacat	cccgcggggc	ccggccgggt	ggtgactccc	acacgggtca	tgctgttgtc	240
tctgtatcca	gcccggccctg	ccaggtgacc	atgcctgctc	tgggcccagc	tcttctccag	300
gctctctggg	ccgggtgggt	cctcaccctc	cagccccttc	caccaactgc	attcactccc	360
aatggcacgt	atctgcagca	cctggcaagg	gaccccacct	caggcaccct	ctacctgggg	420
gctaccaact	tctgttcca	gctgagccct	gggctgcagc	tggaggccac	agtgtccacc	480
ggccctgtgc	tagacagcag	ggactgcctg	ccacctgtga	tgcttgatga	gtgccccag	540
gcccagccta	ccaacaaccc	gaatcagctg	ctcctgggtga	gcccaggggc	cctggtggta	600
tgcgggagcg	tgcaccaggg	ggtctgtgaa	cagcggcgcc	tggggcagct	cgagcagctg	660
ctgctgcggc	cagagcggcc	tggggacaca	caatatgtgg	ctgccaatga	tcctgocgtc	720
agcacggtgg	ggctggtagc	ccagggcttg	gcacggggagc	ccctcctgtt	tgtggggcga	780
ggatacacca	gcaggggtgt	gggggggtggc	attccaccca	tcacaacccg	ggccctgttg	840
ccgcccagacc	ccaagctgc	cttctcctat	gaggagacag	ccaagctggc	agtggggccgc	900
ctctccgagt	acagccacca	cttcgtgagt	gcctttgcac	gtggggccag	cgctacttc	960
ctgttctctgc	ggcgggacct	gcaggctcag	tctagagctt	ttcgtgccta	tgtatctoga	1020
gtgtgtctcc	gggaccagca	ctactactcc	tatgtggagt	tgccctctggc	ctgcaagggt	1080
ggccgctacg	ggctgcagct	gtgtgcagct	gtggccacgt	ccagggaggt	ggcgcatggg	1140
gaggtgctct	ttgcagcttt	ctcctcggct	gcacccccca	ctgtggggccg	gcccccatcg	1200
gcggctgctg	gggcatctgg	agcctctgcc	ctctgtgcct	tccccctgga	tgaggtggac	1260
cggcttgcta	atcgcacgog	agatgcctgc	tacaccgggg	agggctcgtgc	tgaggatggg	1320
accgaggtgg	cctacatcga	gtatgatgtc	aattctgact	gtgcacagct	gccagtggac	1380
accctggatg	cttatccctg	tggctcagac	cacacgocca	gccccatggc	cagccgggtc	1440
ccgctggaag	ccacaccaat	tctggagtgg	ccagggattc	agctaacagc	tgtggcagtc	1500
accattgtaag	atggacacac	catcgctttc	ctgggtgata	gtcaagggca	gctgcacagg	1560
gtctacttgg	gcccagggag	cgatggccac	ccatactcca	cacagagcat	ccagcagggg	1620
tctgcagtga	gcagagacct	cacctttgat	gggacctttg	agcacctgta	tgtcatgacc	1680
cagagcacac	ttctgaagg	tctgtggct	tctgtgtctc	agcacctgga	ctgtgcatct	1740
tgccttgctc	acagggaccc	atactgtggg	tggctcgtgc	tccttggcag	gtgcagtcgc	1800
cgttctgagt	gctcaggggg	ccagggccca	gagcagtggt	tatggagctt	ccagocctgag	1860
ctgggtgtgc	tgcaagtggc	agccatgagt	cctgccaaca	tcagccgaga	ggagacgagg	1920
gaggttttcc	tatcagtgcc	agacctgcca	cccctgtggc	caggggagtc	atatctctgc	1980
cactttgggg	aacatcagag	tctgcctg	ctgactgggt	ctgggtgtgat	gtgcccctcc	2040
ccagacccta	gtgaggcccc	agtgtgcgg	agaggagccg	actacgtatc	cgtgagcgtg	2100
gagctcagat	ttggcgtgt	tgtgatcgcc	aaaacttccc	tctctttcta	tgactgtgtg	2160
gcggtcactg	aactccgccc	atctgcgcag	tgcaggccct	gtgtgagcag	ccgctggggg	2220
tgttaactgg	gtgtctggca	gcacctgtgc	accacaaagg	cctcgtgtga	tgotggggcc	2280
atggttgcaa	gccatcagag	ccgccttgct	tcccagacc	ctcctgcaag	aggtggaccc	2340
agccccctcc	cacccacagc	ccccaaagcc	ctggccaccc	ctgctcctga	caccttccc	2400
gtggagcctg	gggctccctc	cacagccaca	gottcggaca	tctcacctgg	ggctagtctc	2460
tccctgctca	gcccctgggg	gccatgggca	ggttctggct	ccatatcttc	ccctggctcc	2520
acaggtcgc	ctctccatga	ggagccctcc	cctcccagcc	cccaaaatgg	acctggaacc	2580
gctgtccctg	ccccactga	cttcagaccc	tcagccacac	ctgaggacct	cttggcctcc	2640
ccgctgtcac	cgtcagaggt	agcagcagtg	ccccctgcag	accctggccc	cgaggctctt	2700
catcccacag	tgcctctgga	cctgccccct	gccactgttc	ctgccaccac	tttcccaggg	2760
ggcatgggct	ccgtgaagcc	cgccctggag	tggctcagca	gagaaggcgg	cgagctgccc	2820
gaggcggacg	agtgagcggg	gggtgacgca	ccgccttctc	ccacttcac	cctcctctca	2880
ggtgatggag	actcagcaga	gcttgagggc	cctcccgccc	ccctcatcct	cccgtccagc	2940
ctcgactacc	agtatgacac	ccccgggctc	tgggagctgg	aagaggcgac	cttgggggca	3000
agctcctgcc	cctgtgtgga	gagcgttcag	ggctccacgt	tgatgccggt	ccatgtggag	3060
cgggaaatcc	ggctgtcagg	caggaaacctg	caccttttcc	aggatggccc	aggagacaat	3120
gagtgtgtga	tggagctgga	gggcctcgag	gtgggtggtt	aggcccgggg	cgagtgtgag	3180
ccacctccag	ataccagtg	ccatgtcacc	tgccagcagc	accagctcag	ctatgaggct	3240
ctgcagccgg	agctccgtgt	ggggctgttt	ctgcctcggg	ccggccgtct	gcgtgtggac	3300

agtgtctgagg	ggctgcatgt	ggtactgtat	gactgttccg	tgggacatgg	agactgcagc	3360
cgctgccaaa	ctgccatgcc	ccagtatggc	tgtgtgtggt	gtgaggggga	gcgtccacgt	3420
tgtgtgaccc	gggaggcctg	tggtgaggct	gaggctgtgg	ccaccagtg	cccagcgccc	3480
ctcatccact	cgggtggagcc	actgactggg	cctgtagacg	gaggcaccgc	tgtcaccatc	3540
aggggctcca	acctgggcca	gcatgtgcag	gatgtgctgg	gcatgggtcac	ggtggctgga	3600
gtgccctgtg	ctgtggatgc	ccaggagtac	gaggtctcca	gcagcctcgt	gtgcatcacc	3660
ggggccagtg	gggaggagg	ggcggcgcc	acagcgggtg	aggtgccggg	aagaggacgt	3720
ggtgtctcag	aacacgactt	tgcctaccag	gatccgaagg	tccattccat	cttcccggcc	3780
cgcgggccca	gagctggggg	caccgcgtctc	acctgaatg	gctccaagct	cctgactggg	3840
cggctggagg	acatccgagt	ggtggttggg	gaccagcctt	gtcacttgct	gccggagcag	3900
cagtcagaac	aactcgggtg	tgagaccagc	ccacgcccc	cgcttgccac	gctccctgtg	3960
gctgtgtggt	ttggggccac	ggagcggagc	cttcaacgcg	gacagttcaa	gtataccttg	4020
gacccaaga	tcacctctgc	tgccccacc	aagagcttcc	tcagtggagg	acgtgagata	4080
tgcgtccgtg	gccagaatct	ggacgtggta	cagacgcca	gaatccgggt	gaccgtggtc	4140
tcgagaatgc	tcagcccag	ccaggggctt	ggacggaggc	gtcgcgtggt	cccgagagcg	4200
goatgttccc	ttggaccctc	ctgcagtagc	cagcaatttg	aggagccgtg	ccatgtcaac	4260
tcctcccagc	tcatcacgtg	cgcacacct	gccttcccag	gcctgcctga	ggaccccttg	4320
gtccgggttg	aatttatcct	tgacaacctg	gtctttgact	ttgcaacact	gaaccccaca	4380
cttttctcct	ataggccga	ccccaccctg	cagccactca	acctgagga	ccccaccatg	4440
ccattccggc	acaagcctgg	gagtgtgttc	tcctgtggagg	gggagaacct	ggaccttgca	4500
atgtccaagg	aggaggtggt	ggctatgata	ggggatggcc	cctgtgtggt	gaagacgctg	4560
acgcggcacc	acctgtactg	cgagcccccc	gtggagcagc	ccctgccacg	gcaccatgcc	4620
ctocgagagg	cacctgactc	tttgccctgag	ttcacggtgc	agatggggaa	cttgccgttc	4680
tccttggttc	acgtgcagta	tgacggcgag	agccctgggg	cttttctctg	ggcagcccag	4740
ttagggcttg	gggtgggcac	ctctcttctg	gctctgggtg	tcatacatcat	tgtcctcatg	4800
tacaggagga	agagcaagca	ggccctgagg	gactataaga	aggttcagat	ccagctggag	4860
aatctggaga	gcagtgtcgc	ggaccgctgc	aagaagggaat	tcacagacct	catgaactgag	4920
atgaccgatc	tcaccagtga	cctcctgggc	agcggcatcc	ccttctctga	ctacaagggtg	4980
tatgcgagga	ggatcttctt	ccctgggcac	cgcgagtccg	ccttgaccgc	ggacctgggt	5040
gtgcctgaga	gcagacggcc	cactgtggag	caagggctgg	ggcagctctc	taacctgctc	5100
aacagcaagc	tcttctcacc	caagttcatc	cacacgctgg	agagccagcg	caccttttca	5160
gctcgggacc	gtgcctacgt	ggcatctctg	ctcacogtgg	cactgcatgg	gaagcttgag	5220
tatttcactg	acatcctcgc	cactctgctc	agtgcacctg	ttgccagta	tgtggccaag	5280
aacccaagc	tgatgctgcg	caggacagag	actgtggtgg	agaagctgct	caccaactgg	5340
atgtccatct	gtctgtatac	cttctgtagg	gactccgtag	gggagcctct	gtacatgctc	5400
tttcgaggga	ttaagcacca	agtggataag	gggccagtgg	acagtgtgac	aggcaaggcc	5460
aaatacacct	tgaacgacaa	cgcctgtctc	agagaggatg	tggagtaccg	tcccctgacc	5520
ttgaatgcac	tattggctgt	ggggcctggg	gcaggagagg	cccagggcgt	gcccgtgaag	5580
gtcctagact	gtgacaccat	ctcccaggca	aaggagaaga	tgctggacca	gctttataaa	5640
ggagtgcttc	tcaccacgcg	gccagaccct	cgcacccttg	atgttgagtg	gcggtctggg	5700
gtggccgggc	acctcattct	ttctgacgag	gatgtcactt	ctgaggtcca	gggtctgtgg	5760
aggcgctga	acacactgca	gcattacaag	gtcccagatg	gagcaactgt	ggccctcgtc	5820
ccctgcctca	ccaagcatgt	gctccgggaa	aaccaggatt	atgtccctgg	agagcggacc	5880
ccaatgctgg	aggatgtaga	tgaggggggc	atccggccct	ggcacctggt	gaagccaagt	5940
gatgagccgg	agccgccag	gcctcggagg	ggcagccttc	ggggcgggga	gcgtgagcgc	6000
gccaaaggcca	tccttgagat	ctacctgacc	cgctgctgt	ccatgaaggg	cacctgcag	6060
aagttcgtgg	atgacctgtt	ccaggtgatt	ctcagcacca	gcccggccgt	gcccgtcgct	6120
gtgaagtact	tctttgacct	gctggatgag	caggccagc	agcatggcat	ctccgaccag	6180
gacaccatcc	acatctggaa	gaccaacagc	ttgcctctga	ggttctggat	caatataata	6240
aaaaacccgc	agtttgtgtt	cgacgtgcaa	acatctgata	acatggatgc	ggtgctcctt	6300
gtcattgcac	agaccttcat	ggacgcctgc	acctgtggcg	accacaagct	gggcccgggac	6360
tcocccgatca	acaaacttct	gtatgcacgg	gacattcccc	ggtacaagcg	gatggtggaa	6420
aggtactatg	cagacatcag	acagactgtc	ccagccagcg	accaagagat	gaactctgtc	6480
ctggctgaag	tgtctggaa	ctactccgga	gacctcgggg	cgcgagtggc	cctgcatgaa	6540
ctctacaagt	acatcaacaa	gtactatgac	cagatcatca	ctgccctgga	ggaggatggc	6600
acggcccaga	agatgcagct	gggctatcgg	ctccagcaga	ttgcagctgc	tgtggaaaac	6660
aaggctcacag	atctatagga	accagggagc	cacggcctgc	tgttgcttca	gcctggcctg	6720
ggcagccctg	gaagctcggg	ggagaggcca	ccttcttagg	tgcctgtagt	gactgacaag	6780
cagagttagt	ggaaggtgac	tcccagctctc	ctggtggctc	tggcctcggc	cctgtcggat	6840
ccacctccta	gacccggggc	ctcaaggctc	atggggtagt	accagcctg	ctccccgagt	6900

```

ccagcgaccc tgtgacaccg gtctgcaggg agttggggac taagggttc cagagagtgg 6960
ctggaagaga ctccaggccc ctggggagagac tgtactgttc ctgaacactg gccttggcca 7020
cactgggatt cggagaggaa ggaggagagc cccatgcttc ctgtctgcct cctccaccat 7080
ccctgacctc agttgagctg cctctggcct tgttgctgct gccacatcct aggtctaaga 7140
gttgaacgcc tctcctagga cactacaaac tgacccctca gcagggttg ctgccacagg 7200
gctgccctgc ctcataggta gccatggtga gggctatctg ctgcaggggg gtcttgggga 7260
gagtgggtgac tccattgacc cagcttttca ttaaaggata acacactg 7308

```

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 36
 gaattcatgc tgcgcaccgc 20

<210> 37
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 37
 aagcttcact tgtcgtcatc gtccctttag tcctccttcc agtaggacct 50

<210> 38
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 38
 aagcttcagt gatgatgatg atgatgctcc ttccagtagg acctg 45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, A61K39/395, 45/00, A61P35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, A61K39/395, 45/00, A61P35/00, 43/00, G01N33/00, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICSTPLUS, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED, EMBL/DDBJ/Genebank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X/ E, A	WO 2004/058817 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 15 July, 2004 (15.07.04), & JP 2004-290177 A	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2002/052005 A1 (Kazusa DNA Research Institute Foundation), 04 July, 2002 (04.07.02), & US 2002/0192748 A1 & AU 200280608 A (Claims; pages 12 to 18; Sequence listing, Sequence No. 31)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2000/078961 A1 (GENENTECH, INC.), 28 December, 2000 (28.12.00), & AU 200028837 A (Claims; pages 180 to 182, 355; Figs. 141, 142; Sequence listing, Sequence Nos. 252, 253)	2-4, 10, 11/ 15-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 March, 2005 (18.03.05)

Date of mailing of the international search report

05 April, 2005 (05.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019724

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ A	WO 2000/012708 A2 (GENENTECH, INC.), 09 March, 2000 (09.03.00), & AU 9955908 A & ZA 200101180 A & EP 1144629 A2 & US 6144037 A & JP 2002-526075 A & JP 2003-518361 A & KR 2003000010 A & MX 2001002238 A1 (Claims; pages 22, 183 to 185; Figs. 141, 142; Sequence listing, Sequence Nos. 252, 253)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2002/046465 A2 (OXFORD BIOMEDICA LTD.), 13 June, 2002 (13.06.02), & US 2003/0203372 A1 & AU 200220920 A (Claims; page 256; Sequence listing, Sequence Nos. 91, 92)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2001/068848 A2 (GENENTECH, INC.), 20 September, 2001 (20.09.01), & AU 200168028 A & US 2002/0090681 A1 & EP 1259614 A2 (Claims 22 to 23; pages 32, 132; Figs. 453, 454; Sequence listing, Sequence Nos. 453, 454)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2001/077137 A1 (HUMAN GENOME SCIECNES, INC.), 18 October, 2001 (18.10.01), & AU 200033868 A & EP 1173456 A1 (Claims; page 150; Sequence listing, Sequence No. 1271)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2001/036440 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 25 May, 2001 (25.05.01), & AU 200119186 A & EP 1235838 A1 & JP 2003-514543 A (Claims; pages 9 to 13, 94 to 102; Sequence listing, Sequence Nos. 11, 64)	2-4, 10, 11/ 5-18
X/ A	WO 2002/006329 A2 (CURAGEN CO.), 24 January, 2002 (24.01.02), & AU 200180608 A & US 2002/0192748 A (Claims; pages 51 to 58; Sequence listing, Sequence Nos. 17, 18)	2-4, 10, 11/ 15-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019724

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19-23

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 19 to 23 are relevant to methods for treatment of the human body or animal body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)

2. ☒ Claims Nos.: 1, 5-9, 12-14, 24

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019724

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Concerning the inhibitors as set forth in claims 1 and 9, it is completely unknown, even though prior art is taken into consideration, what specific compounds other than the antibody described in EXAMPLE are involved and what are not. Thus, the above claims are described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful opinion can be made on the novelty, inventive step and industrial applicability of the inventions according to the above claims and claims depending thereon except the antibody.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/00, A61K39/395, 45/00 A61P35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/00, A61K39/395, 45/00 A61P35/00, 43/00, G01N33/00, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTPLUS, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED,
EMBL/DBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E, X/ E, A	WO 2004/058817 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2004. 07. 15 & JP 2004-290177 A	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2002/052005 A1 (財団法人かずさディー・ エヌ・エー研究所) 2002. 07. 04 & US 2002/0192748 A1 & AU 200280608 A (請求の範囲, 第12-18頁, 配列表配列番号31参照)	2-4, 10, 11/ 15-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 03. 2005

国際調査報告の発送日

05. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4 B

9 4 5 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	WO 2000/078961 A1 (GENENTECH, INC.) 2000. 12. 28 &AU 200028837 A (請求の範囲, 第180-182, 355頁, 図141, 142, 配列表配列番号252, 253参照)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2000/012708 A2 (GENENTECH, INC.) 2000. 03. 09 &AU 9955908 A &ZA 200101180 A &EP 1144629 A2 &US 6144037 A &JP 2002-526075 A &JP 2003-518361 A &KR 2003000010 A &MX 2001002238 A1 (請求の範囲, 第22, 183-185頁, 図141, 142, 配列表配列番号252, 253参照)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2002/046465 A2 (OXFORD BIOMEDICA LIMITED) 2002. 06. 13 &US 2003/0203372 A1 &AU 200220920 A (請求の範囲, 第256頁, 配列表配列番号91, 92参照)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2001/068848 A2 (GENENTECH, INC.) 2001. 09. 20 &AU 200168028 A &US 2002/0090681 A1 &EP 1259614 A2 (請求の範囲22-23, 第32, 132頁, 図453, 454 配列表配列番号453, 454参照)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2001/077137 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001. 10. 18 &AU 200033868 A &EP 1173456 A1 (請求の範囲, 第150頁, 配列表配列番号1271参照)	2-4, 10, 11/ 15-18
X/ A	WO 2001/036440 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001. 05. 25 &AU 200119186 A &EP 1235838 A1 &JP 2003-514543 A (請求の範囲, 第9-13, 94-102頁, 配列表配列番号11, 64参照)	2-4, 10, 11/ 15-18

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	WO 2002/006329 A2 (CURAGEN CO.) 2002.01.24 &AU 200180608 A &US 2002/0192748 A1 (請求の範囲, 第51-58頁, 配列表配列番号17, 18参照)	2-4, 10, 11/ 15-18

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19-23 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲19-23記載の発明は、治療による人体又は動物の体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 1,5-9,12-14,24 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
(特別ページ参照)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見における2. の続き

請求の範囲1及び9に記載の阻害物質については、化合物として実施例として記載されている抗体以外に具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが先行技術に鑑みても全く不明であつて、前記請求の範囲の記載は著しく不明確であるから、前記請求の範囲及びそれらを引用する各請求の範囲に記載された発明のうち抗体以外については、新規性、進歩性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。